Quantitative Untersuchungen über enzymatische Wirkungen der Reiskleie.

STANFORD UNIVERSITY LIBRARY
FEB
2
1924

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

hohen medizinischen Fakultät

der

Friedrich-Alexanders-Universität zu Erlangen

vorgelegt von

Friedrich Keller
aus Augsburg.

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 1914.

Erlangen.
K. B. Hof- und Universitätsbuchdruckerei von Junge & Sohn.
1914.

Gedruckt mit Genehmigung der hohen medizinischen Fakultät der Universität Erlangen.

Referent: Herr Professor Dr. L. Heim.
Dekan: Herr Geheimer Hofrat Professor Dr. Penzoldt.

Meinen lieben Eltern.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154019_0028

Quantitative Untersuchungen über enzymatische Wirkungen der Reiskleie.

Von Friedrich Keller.

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
Einleitung	2
Über die Beriberifrage	2
Bau und chemische Zusammensetzung des Reiskorns	3
Versuche, wertvolle Kleiebestandteile dem Brot und dem Reis zu erhalten	4
Einige bisherige Befunde über das Vorkommen von Enzymen in keimenden und ruhenden Samen	7
I. Diastatische Enzyme in der Reiskleie	9
1. Allgemeine Bemerkungen	9
a) Die verwendeten Präparate	9
b) Die Methoden des Fermentnachweises	12
2. Wirkung der Reiskleie im Vergleich mit Mundspeichel bei 37° in 3 Tagen	15
3. Die beste Temperatur für die Wirkung der Reiskleie	23
4. Verschieden lange Fermentierung bei 37° und 50°	25
5. Wirkung verschiedener Kleiemengen bei 37°	26
6. Wirkung verschiedener Kleiepräparate auf Reismehlkleister und auf sich selbst bei 37°	28
II. Proteolytische Enzyme in der Reiskleie	30
1. Allgemeine Bemerkungen	30
2. Bestimmung des Stickstoffgehaltes der Reiskleie	32
3. Bestimmung des Stickstoffgehaltes des alkoholischen Auszugs aus der unveränderten und aus der gekochten Reiskleie	33
4. Wirkung auf pflanzliches Eiweiß	34
a) Wirkung auf das Eiweiß der Kleie selbst bei verschiedenen Temperaturen	34
b) Einfluß verschiedener Reaktion	36
5. Wirkung auf tierisches Eiweiß	38
Schlußsätze	42

Einleitung.

Über die Beriberifrage.

Großes medizinisches Interesse hat in neuerer Zeit eine in vielen Ländern epidemisch auftretende Krankheit gefunden, die bei uns nicht zur Beobachtung kommt: es ist die Beriberi. Ihr Vorkommen wird aus allen den Gegenden berichtet, wo sich die Bevölkerung fast ausschließlich von Reis ernährt. Die meisten Forscher haben denn auch die Ursache der Krankheit mit dem einseitigen Reisgenuß in Zusammenhang zu bringen gesucht, namentlich als sie die Wahrnehmung machen konnten, daß gerade der Genuß von stark geschältem Reis, wie ihn z. B. die Japaner und Chinesen vorziehen, die Krankheit begünstigte, während teilweise geschälter Reis ihren Ausbruch zu verhindern schien. Fütterungsversuche, wie sie zuerst der holländische Tropenhygieniker Eijkmann — und zwar an Hühnern — anstellte, ergaben die merkwürdige Analogie, daß die Tiere bei der Fütterung mit völlig geschältem Reis an Polyneuritis erkrankten, während die mit ganzem Reis gefütterten gesund blieben und bereits erkrankte Tiere durch Zugabe von Reisschalen gesundeten. Auf diese Versuche gründet sich die sogenannte Mangeltheorie, d. h. die Annahme, daß die Krankheit ausbricht, wenn in der Nahrung gewisse Stoffe mangeln. Ausgehend von dieser Annahme, suchte man die Art der Stoffe genauer kennen zu lernen. Die Tatsache, daß die Krankheit nach Genuß von geschältem Reis auftritt und durch Fütterung mit Reiskleie (im Tierexperiment und beim Menschen) beseitigt werden konnte, spricht dagegen, daß es sich um eine Intoxikation handle, wie sie von verschiedener Seite angenommen wurde. Nach unserer gegenwärtigen Erkenntnis müssen wir die Mangeltheorie als berechtigt ansehen, die, wie schon bemerkt, in der Annahme gipfelt, daß die Beriberi infolge Fehlens gewisser Stoffe bei einseitiger Ernährung entsteht, wie es Eijkmann, Axel Holst u. a. dargetan haben, und wie es namentlich Nocht betont hat.

An dieser Stelle soll auf die einschlägigen Arbeiten darum nicht näher eingegangen werden, weil wir uns das Studium der Beriberifrage nicht zum Ziel unserer Erörterungen gesetzt haben. Es sei hier verwiesen auf die Zusammenstellungen in

der Literatur, insbesondere in der Monographie[1]) und in anderen Veröffentlichungen von C. Funk[2]) sowie von Eijkmann[3]), Nocht[4]), Schaumann[5]) und Schüffner[6]).

Ich habe auf Veranlassung von Herrn Professor Dr. L. Heim die Stoffe, die beim Mahlen des Reiskornes abfallen, daraufhin untersucht, ob und inwieweit diastatische und proteolytische Fermentwirkungen von ihnen ausgeübt werden. In gewisser Hinsicht stehen ja diese Fragen in Beziehung zu der Frage der Beriberi, insofern zum mindesten, als sie sich sogleich aufdrängen, wenn man sich nach den biologisch wirksamen Stoffen in der Kleie umsieht. Anderseits sind sie halbwegs befriedigend noch nicht beantwortet, insbesondere fehlen quantitative Untersuchungen darüber.

Bau und chemische Zusammensetzung des Reiskornes.

Die morphologischen und chemischen Merkmale des Reiskornes[7]) [8]) [9]) [10]), soweit sie uns hier angehen, lassen sich folgendermaßen kurz zusammenfassen.

Das gedroschene Reiskorn sieht dem Korn unserer Gerste ganz ähnlich, es ist gleich diesem von einer starken, gelblichen Spelzenhülse, die aus zusammenhängenden Zellen mit dicken Zellulose- und Kieselsäurewänden besteht, umschlossen. Entfernt man die Spelzen, was bei dem trockenen Korn leicht gelingt, so kommt man auf die Frucht- und Samenschale, die

[1]) Casimir Funk, Die Vitamine. Wiesbaden, J. F. Bergmann, 1914.

[2]) Münch. med. Wochenschr. 1913, Nr. 36, S. 1897 u. Nr. 47, S. 2614.

[3]) Eijkmann, Archiv f. Hygiene Bd. 58, S. 150, 1906 u. an and. Ort, insbesondere auch seine Entgegnung gegen Wieland, Münch. med. Wochenschr. 1913, Nr. 16, S. 871.

[4]) Nocht, Die Beriberifrage. Jahreskurse für ärztl. Fortb. 1911, Nr. 10, S. 20.

[5]) Berliner Klinik 1913, Nr. 28, S. 1112.

[6]) Münch. med. Wochenschr. 1913, Nr. 12, S. 642.

[7]) J. Moeller, Mikroskopie der Nahrungs- und Genußmittel aus dem Pflanzenreiche. Berlin 1905, S. 211.

[8]) J. König, Untersuchungen landwirtschaftlich und gewerblich wichtiger Stoffe. Berlin 1911, S. 361.

[9]) H. Röttger, Lehrbuch der Nahrungsmittelchemie. Leipzig 1910, S. 376.

[10]) J. König, Die menschlichen Nahrungs- und Genußmittel. Berlin 1903.

als weißes bis bräunliches Häutchen, das sogenannte Silberhäutchen, aus einigen verflochtenen Zellschichten gebildet wird und von dem eigentlichen Mehlkern, dessen Zellen dicht mit den polygonalen Reisstärkekörnern ausgefüllt sind, nur noch durch die einzellige, eiweiß- und fettreiche Aleuronschicht getrennt ist. Je nachdem außer den Spelzen die Frucht- und Samenschale und die Aleuronschicht bei der Vermahlung entfernt wurden, bekommen wir ungeschälten, teilweise geschälten, ganz geschälten und schließlich polierten Reis. Bei dem polierten Reis sind auch die Aleuron- und die oberflächlichen Stärkezellen durch Lederriemen und Bürsten derart abgeschliffen, daß der glatte, glänzende Mehlkern zurückbleibt. Einschlägige Abbildungen finden wir bei C. Funk, der ein Reiskorn mit Frucht- und Samenschale uud ein poliertes Reiskorn, allerdings übernommen aus Abbildungen anderer Autoren, bringt; bei dem polierten fehlt die Frucht- und Samenschale und ein großer Teil der Aleuronzellen, aber ein Rest von Aleuronzellen ist in der farbigen Tafel deutlich abgebildet.

Von den Bestandteilen des Reiskornes bei dem verschiedenen Zustand der Bearbeitung gibt J. König folgende Durchschnittswerte:

	nicht enthülst	enthülst	glasiert
Wasser	12,18	13,18	13,30
N-Substanz	6,38	8,13	7,65
Rohfett	2,08	1,29	0,30
N-freie Extraktstoffe	69,28	75,50	78,18
Holzfaser	6,51	0,88	0,21
Asche	3,57	1,03	0,36

Es ist klar, daß sich je nach dem Grade der Schälung des Reiskornes die Werte für die einzelnen Bestandteile auf den Kern und die Schälabfälle verteilen; so haben wir z. B. in dem in unseren Versuchen mehrfach benützten hochprozentigen Reisfuttermehl, das Schälabfälle darstellt, 10,5 % Proteinsubstanz gefunden, in Knorrs feinstem Reismehl dagegen nur 6,34 %.

Versuche, wertvolle Kleiebestandteile dem Brot und dem Reis zu erhalten.

Das Bestreben der modernen Hochmüllerei, möglichst feine, weiße Produkte zu liefern, bringt es mit sich, daß auch Teile

mit abfallen, die reich an Eiweiß, Fett und Salzen, also für die Ernährung wertvoll sind. Auch der Embryo wird entfernt und findet sich in der Kleie wieder, wo man ihn als helles, keilförmiges Körperchen unter den mehr braun gefärbten Schalensubstanzen erkennen kann. So sind die für die Pflanze in erster Linie lebenswichtigen Teile des Kornes in die Kleie übergegangen, und für die menschliche Ernährung bleibt im wesentlichen nur das mächtige Stärkedepot, das im Korn für den Keimling aufgespeichert ist, daneben noch der im Mehlkern enthaltene Kleber. Der Reis, bei dem die Eiweißstoffe mehr auf die peripheren Schichten verteilt sind, ist innen relativ reicher an Stärke und ärmer an Eiweiß als viele andere Getreidearten; demzufolge sind die Müllereiprodukte aus dem Reis eiweißarm; die eiweißreichere Reiskleie wird als wertvolles Viehfutter unter dem Namen Reisfuttermehl in gewaltigen Mengen aus den Reisländern ausgeführt. Zwar vermag auch der Magen und Darm der Nutztiere nur einen Teil der Zellulose richtig zu verdauen, aber erfahrungsgemäß bleibt das Vieh gesund und gedeiht gut. So werden, wie Rubner schon vor vielen Jahren ausgesprochen hat, die in der Kleie enthaltenen wertvollen Nahrungsstoffe mittelbar dem Menschen nutzbar gemacht, aber man muß sich doch fragen, ob durch die ausgiebige Schälung nicht eine zu weitgehende Entwertung der Zerealien erfolgt; denn anerkanntermaßen sind größere Bevölkerungsklassen durch andauernden, einseitigen Genuß des extrem fein zermahlenen, von Schalenteilen befreiten Reises geschädigt worden.

Auch bei der Beurteilung der feinen Vermahlung unserer einheimischen Getreide zu Brotmehlen ist auf den wesentlichen Verlust an Eiweißstoffen und Salzen durch zu weit gehenden Kleieauszug hingewiesen worden, darum hat man bereits verschiedene Verfahren der Brotbereitung versucht, um dem Menschen möglichst alle wertvollen Bestandteile des Vollkornes zu erhalten. So entstanden zuerst die Schrot- und Grahambrote. Die allgemeinere Verwendung dieser Brotsorten wird dadurch etwas eingeschränkt, daß sie durch ihren Gehalt an gröberen Schalenteilchen bei empfindlichen Personen zu Darmreizungen und Durchfällen führen können. Auch das Kommißbrot der Soldaten und das schwarze Bauernbrot ist aus

Mehl, das nur 15 % Kleie (Kleieauszug) verloren hat, bereitet, während feinstes Weißbrotmehl nur noch etwa 65 % des ursprünglichen Kornes enthält.

Nach dem Verfahren von Stephan Steinmetz wurden nur die groben Spelzen in feuchtem Zustande durch Abdrücken entfernt, wobei die wertvollen Schalenteile zurückbleiben, so daß nach der Trocknung und Vermahlung ein vollwertiges Mehl erhalten wird. Ähnlich ist auch das Gelincksche Verfahren, das später von Simons mit Abänderungen übernommen worden sein soll, bei dem das Korn nach mehrstündigem Aufweichen in Wasser zerquetscht und vermälzt wird, so daß ein Teig entsteht, der hauptsächlich durch auflockernde Eigengärung — eine Wirkung von Bakterien, nach Lehmann und Wolffin[1]) — backfähig wird. Es kämen hier noch verschiedene Bereitungsweisen zum Teil mit nur lokaler Verbreitung, in Betracht; gewiß ist es vorteilhafter und vernunftgemäßer, sich an solch nährsalzreichere Brote zu halten als durch künstliche Nährpräparate den Schaden des Weißbrotgenusses ausgleichen zu wollen.

Was nun den Reis betrifft, so wird bei uns zu Lande, wo auch die ärmeren Bevölkerungsschichten eine gewisse Abwechslung und Mehrseitigkeit in der Ernährung gewohnt sind, kaum eine Schädigung durch einseitigen Genuß polierten Reises zu befürchten sein. Wenn wir vom ärztlichen wie volkswirtschaftlichen Standpunkt auch nur ungern Eiweiß und Salze in so hohem Grade mit der Kleie abfallen sehen, so können wir den Reis doch in der teilweise geschälten wohlfeilen Form als ein wertvolles, durch vielseitige Verwendungsmöglichkeit angenehmes Nahrungsmittel ansehen und seine Anwendung in der Küche mehr empfehlen, als bisher geschah. In manchen Ländern, wo der Reis das hauptsächlichste und oft alleinige Nahrungsmittel ist, hat man zur Vermeidung von Gesundheitsschädigungen für staatliche Lieferungen einen höchsten noch zulässigen Kleieauszug festgesetzt.

Wir wollen nun nicht mit Forschern wie Funk, Schaumann u. a. jene lebenswichtigen Stoffe, deren Wegfall bei der Ernährung mit Reis schwere gesundheitliche Nachteile entstehen läßt, analysieren und die Entstehung jener Nachteile

[1]) K. B. Lehmann u. A. Wolffin, Hygienische Studien über Mehl und Brot. Arch. f. Hyg. Bd. 21, S. 215 u. 268. 1894.

durch Tierversuche zu beweisen versuchen, wir gehen vielmehr dem Gedanken nach, ob man die Ausnutzbarkeit des Reises nicht etwa in der Weise verbessern kann, daß man der Zubereitung eine enzymatische Wirkung vorangehen läßt. In dieser Hinsicht ist zunächst die Frage zu untersuchen, ob die biochemischen Bedingungen dazu in dem Reiskorn vorhanden sind, insbesondere, ob für den Abbau von Stärke und Eiweiß in der Reiskleie von Haus aus Enzyme vorhanden sind, und wie sie außerhalb des Körpers in Erscheinung treten.

Einige bisherige Befunde über das Vorkommen von Enzymen in keimenden und ruhenden Samen.

Wegen ihrer großen, wirtschaftlichen Bedeutung für die Brauindustrie fanden zuerst die keimenden Samen der Getreide eingehende Bearbeitung, aus der hervorging, daß in diesen Samen Eiweiß, Fett und Kohlenhydrat abbauende Fermente vorhanden sind.

Eine Verzuckerung der Stärke durch Malz ist[1]) schon vor mehr als 100 Jahren von Irwine, Kirchhoff, Saussure beobachtet worden. Aus verschiedenen keimenden Samen haben 1833 Payen und Persoz ein stärkeverzuckerndes Ferment dargestellt und Diastase genannt; aus keimenden Wicken, Hanf, Gerste, Leinsamen u. a. konnte von Gorup-Besanez diastatisch und proteolytisch wirkende Extrakte gewinnen. Überhaupt konnten bei den lebenden Pflanzen an vielen Stellen Fermente nachgewiesen werden, bei ruhenden Samen ist dagegen mancher negative Befund mitgeteilt. Positive Ergebnisse hatten u. a. Kjehldahl[2]), Tanaka[3]) bei Gramineen. Am bekanntesten sind die Arbeiten von Ellenberger und Hofmeister[4]), die in vielen ungekeimten Samen, darunter von Hafer, Gerste, Reis, Wicken, hauptsächlich diastatische Fermente feststellten und ihre Bedeutung für die Verdauung der

[1]) Nach C. Oppenheimer, Die Fermente. 4. Aufl. 1913, S. 308 ff.

[2]) Kjeldahl, Untersuchungen über zuckerbildende Fermente. Resum. d. Labor. Carlsberg, I, 1879. Nach Malys Jahrb. IX, S. 381. 1880.

[3]) Tanaka, D., Hydrolytische Enzyme in den ruhenden Samen einiger Gramineen. Coll. Eugin. Tokyo, 4, S. 39. Nach Malys Jahrb. S. 828 (1908).

[4]) Ellenberger und Hofmeister, Arch. f. wiss. u. prakt. Tierheilk. Bd. 14, S. 55 (1888).

Samen durch pflanzenfressende Tiere im Tierversuch außer Zweifel setzen konnten. Ihre Schüler Scheunert und Grimmer[1]) wiesen auch proteolytische Enzyme in verschiedenen ruhenden Getreidesamen nach und bewiesen ebenfalls ihre günstige Mitwirkung bei der Verdauung im Organismus der Pflanzenfresser. Als weitere Arbeiten über proteolytische Fermente in ungekeimten Samen seien hier genannt die von Kobert[2]) und seinen Schülern, insbesondere die qualitativen Prüfungen verschiedener Samen auf verschiedene in ihnen enthaltene Enzyme durch Wakulenko, ferner von Aron und Klempin[3]), die ungekeimten Hafer, Gersten- und Wickensamen nach einem Verfahren, das dem von uns angewendeten ähnlich war, quantitativ untersuchten; dann die Arbeiten von Giessen[4]) und Wohllebe[5]), auf die wir noch zurückkommen werden.

Bezüglich der Frage, in welchem Teil des Kornes und zu welchem Zweck die Fermente gebildet werden, heißt es bei Oppenheimer, Die Fermente, S. 84: „Am wichtigsten sind die Fermente der keimenden Samen, die auch in ruhenden nicht ganz fehlen. Aktiviert werden sie aber wohl erst bei der Keimung oder bei der Autolyse. Sie sind für die Entwicklung des Embryos von größter Bedeutung, da er mit ihrer Hilfe die Reservestoffe aufschließt (Proteine, Fette und Stärke resp. Hemicellulose und Glykoside). Die notwendigen Fermente der Samen werden vom Embryo selbst produziert. Auch ausgelöste Embryonen konnten sich auf Nährböden entwickeln“... und weiter S. 310: „Sicher wird die Hauptmenge der Amylase

[1]) A. Scheunert und W. Grimmer, Zur Kenntnis der in den Nahrungsmitteln enthaltenen Enzyme und ihrer Mitwirkung bei der Verdauung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 27. 1906.

[2]) R. Kobert, Beiträge zur Kenntnis der vegetabilischen Hämagglutinine. 2. Heft. Landwirtschaftliche Versuchsstationen Bd. 82, S. 1: Iwan L. Wakulenko, Über die fermentativen Eigenschaften der vegetabilischen Hämagglutinine und der Futterkuchen.

[3]) H. Aron und P. Klempin, Studien über die proteolytischen Enzyme in einzelnen pflanzlichen Nahrungsmitteln. Biochem. Zeitschr. 9, S. 163. 1908.

[4]) R. Giessen, Über die proteolytischen Fermente der als Futtermittel benützten Körnerfrüchte. Dissert., Bern 1909.

[5]) H. Wohllebe, Untersuchungen über die Ausscheidungen von diastatischen und proteolytischen Enzymen bei Samen und Wurzeln. Dissert., Leipzig 1911.

von dem Schildchen (Scutellum) der Embryonen abgesondert. Hier findet auch die stärkste Zunahme während der Keimung statt. Fraglich ist es aber, ob außerdem auch noch die Aleuronzellen und ferner, ob auch Endospermzellen ohne Embryo und Aleuronzellen Amylase sezernieren, ob also die Reservestoffe sich sozusagen selbständig auflösen.“ In ruhendem Samen findet eine Sekretion der Amylase nur in geringem Maße aus unverletzten Zellen statt (Wohllebe, s. S. 8.)

Auch noch an anderer Stelle in Oppenheimers „Fermente“ finden wir die Angabe, daß der ruhende Same kein Ferment oder nur geringe Mengen enthalte; es sei nur eine Vorstufe, aus der bei Bedürfnis ein aktives Ferment produziert werde. Da nun, wie erwähnt, der Embryo in die Kleie abfällt, durften wir erwarten, daß auch Enzyme in die Kleie mit hineinkommen. Nachdem einige Versuche Fermentwirkungen der Kleie hatten erkennen lassen, suchten wir quantitative Resultate zu erhalten, indem wir entweder bestimmte Mengen Reiskleie unter verschiedenen Bedingungen der Autolyse unterwarfen oder sie auf reines Reismehl, das vorher verkleistert und sterilisiert worden war, einwirken ließen.

I. Diastatische Enzyme in der Reiskleie.

1. Allgemeine Bemerkungen.

a) Die verwendeten Präparate.

Als Mehl, auf das wir die Enzyme wirken ließen, verwendeten wir zwei in Packungen erhältliche Präparate, ein Reispudermehl, dessen Eiweißgehalt wir zu 7,44 %, und Knorrs feinstes Reismehl, dessen Eiweißgehalt wir zu 6,34 % festgestellt hatten. (Über das mikroskopische Aussehen dieser Präparate vgl. die kurzen Angaben auf S. 29). Bei der Kleie hatten wir die Auswahl unter einer größeren Zahl von Präparaten mit verschiedenem Protein- und Kohlenhydratgehalt, da im Handel verschiedene Produkte unter dem Namen Reiskleie gehen. So befindet sich in dem Futtermittelbuch, das vom Verein deutscher Großhändler in Dünge- und Kraftfuttermitteln E. V., Berlin 1914, herausgegeben ist, S. 13—15 folgende übersichtliche Erklärung, die hier wörtlich abgedruckt sei, weil sie für manche Untersucher von Interesse sein kann:

„Reiskleie, Reishülsenmehl, Reisspelzenmehl sind ge-

mahlene Reisschalen (Reishülsen), die beim Schälen von rohem Reis (Paddy) abfallen und namentlich in stroharmen Jahren infolge ihres billigen Preises auch als solche wie Strohhäcksel Verwendung finden. Reiskleie ist ein geringwertiges, kieselsäurereiches Füllfutter, welches niemals allein, sondern mit nährstoffreicheren Futtermitteln zusammen verfüttert wird. Sie enthält etwa 5 % Protein + Fett, 25—30 % Kohlehydrate und ist sehr rohfaserreich (bis 40 %). Der Gehalt an mineralischen Verunreinigungen (Sand, Marmorstaub) darf bedingungsweise 3 % nicht überschreiten, höherer Besatz ist ohne besondere Angabe unzulässig. Die Kieselsäure der Reishülsen darf nicht als Sand angesprochen werden.

Gewalzte Reiskleie ist eine der groben Weizenkleie ähnlich aussehende, grobe Reiskleie, die durch Zylinder unter starkem Druck breitgequetscht ist und vom Vieh, da sie weniger scharf und staubig ist, lieber gefressen wird als ungewalzte Reiskleie.

Handelt es sich also bei der Reiskleie nicht um eine tatsächliche Kleie, sondern um ein Schalenmehl, so ist der richtige „Kleieabfall" unter dem Namen

Reisfuttermehl im Handel. Hievon unterscheidet man 4 Sorten:

1. Das gelblich-braune, bei der Reisschälerei von den ersten Schälgängen abfallende Reisfuttermehl besteht in der Hauptsache aus der nach Entfernung der äußeren Reisschale das Reiskorn umgebenden Fetthaut (Epidermis), welche mit den Keimen und den hülsigen Spelzenteilen des Reiskornes ein wertvolles und nährstoffreiches Kraftfuttermittel darstellt. Es enthält mindestens 15—22 % Protein + Fett neben 30—40 % Kohlehydraten, während die hochprozentigen Sorten mit 24—28 % Protein + Fett neben 40—50 % Kohlehydraten in den Handel kommen.
2. Das weiße, beim Schälen und Polieren von Reis vom dritten und vierten Schälgang oder Polierkegel abfallende Reisfuttermehl enthält meist weniger Protein + Fett (12—22 %), aber mehr Kohlehydrate, (45—60 %) als das gelblich-braune Reisfuttermehl.
3. Das bei der Reisstärkefabrikation abfallende Reisfuttermehl (Reisstärkeabfälle) ist weniger fettreich, enthält aber

mehr Kohlehydrate (60—80 %) als das bei der Reisschälerei abfallende Reisfuttermehl.

4. Das entölte Reisfuttermehl ist der gedarrte Rückstand von Reisfuttermehl der Reisschälerei, welchem das Fett durch Extraktion zum größten Teil entzogen ist.

Ein höherer Gehalt an Bruchreis als 5 % ist bei der Einfuhr von Reisfuttermehl unzulässig. Als Bruchreis werden Reisstücke, die nicht durch Drahtgaze 20 hindurchgehen, aufgefaßt. Bruchstücke, welche durch Drahtgaze 20 hindurchfallen und beim Schälen oder Polieren von Reis entstanden sind, werden als minderwertige Reissplitter angesehen, die in Reisfuttermitteln zulässig sind. Bei erheblicherem Gehalt der Reisfuttermehle an Teilchen des Mehlkörpers wird bei der Einfuhr Vergällung mit 1 % Kohlenstaub verlangt.

Deutsche Erzeugung etwa 2mal 100000 dz., Einfuhr über 2 Millionen dz., hauptsächlich aus Ostindien, Amerika, Italien, Spanien. Im Handel nach Herkunft und Marken.

Verfrachtung: Reisfuttermehl und Abfälle der Reisstärkefabrikation nach Spezialtarif 3 und Stückgutsspezialtarif, Reisschalen, Reishülsen, d. h. die Spelzen, die das Korn umschließen, und Reiskleie nach der Allg. Warenladungsklasse. Nach dem Eisenbahntarif soll Reisfuttermehl zum größten Teil aus den gemahlenen Frucht- und Samenhäuten (Silberhäuten) des inneren Reiskerns bestehen, denen in geringem Umfange Staub, gemahlene Hülsen und Keimspitzen beigemengt sind. Futterreis nach Spezialtarif I.

Reiskuchen, Abfälle beim Schälen und Polieren von Reis, zu harten, hell- bis dunkelgrauen Tafeln gepreßt, mit 25—35 % Protein + Fett und 35—45 % Kohlehydraten. Aus Spanien eingeführt.

Futterreis, Bruchreis, ausgesiebter Reis verschiedenster Sorten, aus kleinen Körnern, Bruch und Abfällen bestehend. Glutenreis sind Rückstände der Reisstärkeerzeugung."

Es war uns durch das dankenswerte Entgegenkommen einer Nürnberger Mehlgroßhandlung möglich, die genannten Kleien und Futtermehle genau nach obigen Vorschriften aus erster Hand zu bekommen. Wir wählten auf Grund der Angaben des Futtermittelbuches in erster Linie das unter „Reisfuttermehl, Sorte 1" genannte gelblich-braune Präparat und verwendeten davon sowohl das gewöhnliche von den ersten Schälgängen abfallende, das nach unseren Stickstoffbestim-

mungen in 100 g 1,54 g N, d. h. 9,62 % Proteinsubstanz enthielt, wie das hochprozentige, bei dem wir in 100 g 1,68 g N, d. i. 10,5 % Proteinsubstanz fanden. Beide hatten eine grobmehlartige Beschaffenheit und enthielten im wesentlichen keine größeren Schalen- und Bruchreisteilchen, als wir sie im Grieß kennen. Wenn wir der Kürze halber und zum deutlichen Gegensatz gegenüber den Reismehlen im folgenden den Ausdruck Kleie gebrauchen, so ist darunter also vom müllereitechnischen Standpunkt das Reisfuttermehl zu verstehen.

Die Gefahr, daß das Enzym abgenommen hätte, wenn die Reiskleie von Ernten früherer Jahre herstammen sollte, bestand nicht, da sich die Fermente nach Kovehoff[1]) und Zaleski[2]) auch in Samen, die durch Erfrieren oder durch Azeton abgetötet waren, und nach Bruschi[3]), White[4]), Brocq-Rousseau[5]) in Samen, die seit 20 und mehr Jahren abgestorben waren, noch wirksam fanden.

b) Die Methoden des Fermentnachweises.

Bei experimentellen Fermentstudien pflegt man, sofern es möglich erscheint, gern darauf auszugehen, die Fermente von dem Material, an dem sie haften, das sie einschließt (Zellen, Gewebe u. s. w.), zu trennen. Der Gedanke, mit Kleienextrakten zum mindesten einige Versuche zu machen, ist selbstverständlich auch von uns erwogen worden. Zunächst aber lag für uns kein Grund vor, die Enzyme auszuziehen, wir wollten uns lediglich von dem Vorhandensein und der Stärke der Fermentwirkung der Kleie überzeugen. Infolgedessen entfielen für uns Auszüge mit Glyzerin, verdünnten Säuren und Alkalien, Salzlösungen oder die Ausfällung mit Alkohol, Schwermetallsalzen, oder die Herstellung von Preßsäften. Wir ließen die Kleie einfach auf abbaufähiges Material einwirken.

Für die Beurteilung des enzymatischen Vorganges stehen nun zwei Wege offen: entweder der Nachweis, daß durch die

[1]) Angeführt nach C. Oppenheimer, Die Fermente. 4. Aufl. 1913, S. 608.

[2]) Ebenda.

[3]) Ebenda, S. 309.

[4]) Ebenda.

[5]) Ebenda.

Fermentwirkung gewisse Stoffe zum Verschwinden gebracht wurden, oder daß durch sie Stoffe entstanden sind, die vorher nicht da waren. Es ist einleuchtend, daß der letztere Weg öfters beschritten wurde, weil er manche Fehlerquelle umgehen läßt und die Spaltprodukte oft auch leichter chemisch zu fassen und quantitativ zu bestimmen sind als die Ausgangsmaterialien.

So ermittelten Lintner sowie Sherman, Kendall und Clark[1]) die Wirkung von Diastase in Stärkelösung durch quantitative Bestimmung des entstandenen Zuckers nach einer der bekannten Reduktionsmethoden. An sie lehnen sich die meisten Untersucher an, doch wurde auch die Verflüssigung und die Viskositätsänderung der Stärke durch die Diastase zur Messung herangezogen. Das Verschwinden der Jodstärkereaktion wurde von Dettmer, Roberts, Wohlgemuth[2]) zu einer quantitativen Bestimmungsmethode benutzt. „Mit Recht", heißt es bei Oppenheimer, „ist gegen alle Methoden, die nur das Verschwinden der Stärke prüfen, der Einwand gemacht worden, daß sie tatsächlich nicht die Gesamtwirkung der Amylase messen. Das kann nur die Bestimmung des entstandenen Zuckers leisten". Auch wir gaben dieser Methode den Vorzug: wir bestimmten maßanalytisch nach Fehling die reduzierende Kraft der erhaltenen Zuckerlösungen, nachdem wir sie durch genau bemessene Verdünnung[3]) auf 0,4 bis 0,6 % Zuckergehalt, gedacht als Gehalt an Glykose, gebracht hatten. Außerdem bestimmten wir mittels des Polarisationsapparates bei Natriumflamme die Drehung. Dabei zeigte sich stets ein höherer „Zuckerwert" als bei der Titration, der zwar nicht ohne weiteres maßgebend sein konnte, weil man auch mit dem Vorhandensein anderer drehender Stoffe[4]) rechnen mußte, aber eine gute Ergänzung zur Titration insofern gab, als er eine große Menge rechtsdrehender

[1]) Angeführt nach C. Oppenheimer, Die Fermente. S. 283 u. 285.

[2]) Ebenda.

[3]) Das Maß der Verdünnung ergab sich in jedem einzelnen Fall aus einer orientierenden Probetitration. Auf diese Vorprobe hin wurde die betr. Zuckerlösung so weit mit Wasser verdünnt, daß zur Entbläuung von 10 ccm Fehlingscher Lösung nicht weniger als 8 und nicht mehr als 12 ccm der verdünnten Flüssigkeit notwendig waren.

[4]) Inwieweit man mit der Gegenwart linksdrehender Substanzen, z. B. linksdrehender Stickstoffverbindungen, rechnen müßte, soll hier nicht weiter erörtert werden.

Substanzen (= RS) erkennen ließ, deren Drehungsvermögen offenbar viel stärker war als das des Traubenzuckers. Daß nach allen Erfahrungen über enzymatische Verzuckerung auch hier als das Hauptprodukt der Enzymwirkung Maltose vorausgesetzt wurde, deren Drehungsvermögen mehr als $2^1/_2$ mal so groß ist wie das der Glykose, braucht kaum besonders hervorgehoben zu werden.

Die Enzymwirkungen haben wir nach bestimmten Zeiten durch reichliche Zugabe von Alkohol unterbrochen, von dem es bekannt ist, daß er sich dazu eignet. Übrigens haben wir uns davon außerdem durch einen orientierenden Versuch selbst überzeugt:

Ein im vollen Gang befindlicher Verdauungsversuch von Reismehlkleister mit Kleie wurde durch Zugabe des doppelten Volums 96 % igen Alkohols unterbrochen. Nach 6 Stunden wurde ein kleiner Teil der Flüssigkeit abfiltriert und ihre Drehung bestimmt. Das gleiche geschah nach 24 und 72 Stunden. Die so erhaltenen Polarisationswerte zeigten sich nicht wesentlich verändert, so daß eine weitere Bildung von rechtsdrehender Substanz nicht erfolgt sein konnte.

Wir erachteten die Unterbrechung der Fermentation durch Alkohol für einfacher und genauer als die durch hohe oder niedrige Temperaturen, also durch Aufkochen oder durch starke Abkühlung, zumal da man mit ziemlicher Sicherheit annehmen kann, daß durch die Alkoholzugabe die Verhältnisse zwischen der noch ungelösten Stärke und den in Lösung gegangenen abfiltrierbaren Zuckermengen in der für uns in Betracht kommenden Konzentration nicht geändert würden. Außerdem hatte man beim Alkohol den Vorteil, daß er schöne klare Filtrate liefert, wie wir sie bei wässerigen Auszügen nicht immer bekamen, weil Lipoide (Lezithin) und alkohollösliche Stickstoffverbindungen u. s. w. das Wasser trüben, während sie in 65 % igem Alkohol klar gelöst bleiben, so daß das Filtrat zur Polarisation ganz geeignet war.

Vom Anfang an haben wir allen unsern Proben, wenn sie nicht bei Temperaturen gehalten wurden, die das Wachstum von Kleinwesen ausschließen, Toluol zugesetzt, um die Entwicklung von Bakterien, Schimmelpilzen und Hefen hintanzuhalten, ohne die Wirkung der Enzyme bemerkenswert zu be-

einträchtigen. Nur muß man dafür sorgen, daß es stets in genügender Menge vorhanden ist. Wir nahmen gewöhnlich 10 ccm Toluol auf etwa $^1/_4$ Liter Flüssigkeit. Weniger wirkt nicht mehr sicher, und man muß verhindern, daß der Gehalt durch Verdunstung wesentlich abnimmt. Als wir eine Versuchsreihe in Bechergläsern 3 Tage im Brutschrank bei 37° mit Toluol stehen ließen, machten wir die Erfahrung, daß keine der Proben, die mit Petrischalen bedeckt waren, Bakterienwachstum erkennen ließen, daß aber eine Probe, die mit einer weniger gut abschließenden Uhrschale bedeckt war, den charakteristischen Toluolgeruch ziemlich verloren hatte und auf der Oberfläche des Inhaltes eine zarte Haut aufwies, die sich bei der mikroskopischen Untersuchung als aus grampositiven, sporenbildenden Stäbchen bestehend herausstellte.

2. Wirkung der Reiskleie im Vergleich mit Mundspeichel bei 37° in 3 Tagen.

Um die diastatische Wirkung der Reiskleie in Form des hochprozentigen Reisfuttermehls durch Vergleich mit der Wirkung eines physiologischen amylolytischen Sekretes näher zu bestimmen, wurden im Verlauf einiger Stunden 30 g Mundspeichel in einem Becherglas, das etwas Toluol enthielt, gesammelt und mit 120 g destillierten Wassers gut vermischt, so daß auf 20 g Speichellösung 5 g Speichel kamen. Die Speichellösung ließen wir nun sowohl parallel mit der Reiskleie wie auch mit ihr vereint auf das Substrat einwirken. In Berücksichtigung der praktischen Verhältnisse wurde nicht reine Stärke, sondern Reispudermehl als Verdauungsobjekt genommen und zwar als Kleister, da die verkleisterte Stärke erfahrungsgemäß leichter von den diastatischen Fermenten angegriffen wird als die rohe; um alle vielleicht in dem Kleister noch vorhandenen Fermente abzutöten, wurden die einzelnen Kleisterportionen im strömenden Dampf sterilisiert.

Im ganzen wurden folgende 10 Proben angesetzt:

1. Reiskleister
2. Reiskleister + Speichel
3. Reiskleister + Speichel + Kleie roh
4. Reiskleister + Speichel + Kleie sterilisiert

5. Reiskleister + Kleie roh
6. Reiskleister + Kleie sterilisiert

und als Kontrollen:

7. Wasser + Speichel + Kleie roh
8. Wasser + Speichel + Kleie sterilisiert
9. Wasser + Kleie roh
10. Wasser + Kleie sterilisiert.

Für die 6 Kleisterproben waren 120 g Mehl + 1200 g Wasser nötig; wegen allenfallsiger Verluste wurde aber noch eine Portion mehr als Reserve bereitet, also 140 g Mehl + 1400 g Wasser genommen. Die Verkleisterung erfolgte auf dem Wasserbade, wobei die Temperatur des Kleisters 70° erreichte und 80 g Wasser verdampften, die nachher wieder ergänzt wurden.

Von dem fertigen Kleister füllten wir auf der Wage je 220 g (mit einem Mehlgehalt von 20 g) in 6 tarierte Erlenmeyerkolben ab, stellten sie zugleich mit 4 andern, die lediglich 210 g Leitungswasser enthielten, in den Dampfapparat und erhitzten $^1/_2$ Stunde, vom Sieden des Wassers an gerechnet.

Unterdessen wurden 4 Portionen von je 5 g Reiskleie abgewogen und zwei von ihnen in große Bechergläser von über 1 l Inhalt, die andern beiden in zwei kleinere Bechergläser gegeben.

Nach dem Herausnehmen der 10 Erlenmeyerkolben aus dem Dampftopf wurde das Wasser aus zwei Wasserkolben möglichst heiß in die zwei kleineren Bechergläser über die Kleie geschüttet. Ebenso wurde der Kleister aus zwei Kleisterkolben in die zwei großen Bechergläser über die Kleie geschüttet und zwar quantitativ unter Zuhilfenahme einer Federfahne und etwas Wasser; die Bechergläser waren hier deshalb groß genommen worden, weil das Kleister-Kleiegemisch beim Dämpfen stark in die Höhe zu steigen pflegt. Um die Fermente der Kleie nicht zur Wirkung kommen zu lassen, wurden die vier Bechergläser zusammen mit allen übrigen Proben alsbald wieder dem noch heißen Dampfapparat übergeben. Nach $^3/_4$ stündigem Erhitzen ließen wir im Apparat abkühlen und nahmen dann die 10 Gefäße heraus.

Ihr Inhalt wurde nun in ebensoviele tarierte Literflaschen, allenfalls unter Zuhilfenahme einer Federfahne und von etwas

dest. Wasser, übergefüllt. Dann wurden abermals 4 Portionen von je 5 g Kleie abgewogen und in die in der Übersicht unter Nr. 3 und 5 verzeichneten Kleisterproben und in die Wasserproben Nr. 7 und 9 eingetragen.

Endlich erhielten die Flaschen Nr. 2, 3, 4 sowie 7 und 8 einen Zusatz von je 20 ccm Speichellösung (enthaltend je 5 g Mundspeichel) und sämtliche 10 Flaschen einen Zusatz von je 10 ccm Toluol. Dann wurden sie mit Korken verschlossen, kräftig durchgeschüttelt und in den Brutschrank bei 37° gestellt.

Während der folgenden Tage schüttelten wir die Flaschen wiederholt, wobei sich die Konsistenz des Kleisters in Flasche 1 und 6 unverändert erhalten zeigte, während die übrigen Proben erheblich dünnflüssiger erschienen. Nach 72stündigem Stehen im Brutschrank wurden die Flaschen gewogen und so das Gewicht des Inhaltes bestimmt. Nun wurde zur Unterbrechung der Fermentation 96 %iger Alkohol zugesetzt und zwar dem Volumen nach die doppelte Menge des Gewichts des Flascheninhaltes, da dies einfacher auszuführen war als eine Wägung des Alkohols. Bei der späteren Berechnung wurde vom Gewicht des gesamten Flascheninhaltes das Gewicht des Stärkemehls und der Kleie (zusammen 25 g) abgezogen; man hatte dann mit dem Gewicht des Wassers auch das Volumen. Beide Raummengen, d. h. das Volumen des Wasserinhaltes jeder Flasche und das doppelt so große Volumen des zugefügten Alkohols, wurden addiert und diese Summe später der endgültigen Berechnung der durch Polarisation oder Titration in einem aliquoten Teil gefundenen Werte rechtsdrehender Substanzen (= RS.) oder Glykose zu Grunde gelegt. Die mit Alkohol versetzten Proben ließen wir weitere 24 Stunden unter wiederholtem Aufschütteln zur Extraktion im Brutschrank stehen. Dann wurden sie zur nochmaligen Kontrolle gewogen und — nach mehrstündiger Abkühlung im Zimmer — aufgearbeitet. Die Filtration durch glatte Filter ging schnell vonstatten und lieferte im allgemeinen ein klares, gelblich gefärbtes Filtrat; in den Fällen, wo das erste Filtrat leicht getrübt erschien, wurde es noch einmal auf das Filter zurückgegossen, so daß kein Extrakt weiter verarbeitet wurde, das nicht von durchgegangenen Teilchen völlig frei und ganz klar gewesen wäre; er war dann auch für die Polarisation durchaus geeignet. Da

Gewicht und Volumen jeder Probe durch Wägung und Messung in der angegebenen Weise genau festgestellt worden war, konnte jedesmal ein bestimmter Teil des Filtrates für die Titration des „Zuckers“ nach Fehling verwendet und aus dem gefundenen „Zucker“gehalt dieses Teiles der „Gesamtzucker“gehalt der ganzen Probe berechnet werden; auf diese Weise war es möglich, von dem Flüssigkeitsquantum, das der Filterrückstand noch reichlich zurückhielt, ganz abzusehen; bei allen Proben, deren Gesamtvolumen zwischen 700 und 800 ccm betrug, wurden ohne Schwierigkeit bei dem raschen Verlauf der Filtration mindestens 600 ccm Filtrat erhalten. Davon wurden jedesmal 500 ccm genau im Meßkolben abgemessen und zur quantitativen Zuckerbestimmung verwendet; um beim Filtrieren die Verdunstung von Alkohol zu verringern, haben wir die Trichter stets mit Petrischalen bedeckt gehalten. Die abgemessenen 500 ccm wurden auf dem Wasserbad auf etwa 20 ccm eingedampft, bis keine Spur von Alkoholgeruch mehr wahrzunehmen war; dann nahmen wir den Rückstand mit wenig warmem Wasser auf, führten ihn unter sorgfältiger Vermeidung von Verlusten in Meßkölbchen von 100 ccm über, ließen völlig erkalten und füllten mit destilliertem Wasser bis zur Marke auf. Bei Proben, bei denen nur ganz geringe Zuckerwerte zu erwarten waren, wurde ein 50 ccm fassendes Meßkölbchen benützt. Die einzelnen Rückstände zeigten von vornherein in bezug auf ihre Konsistenz erhebliche Unterschiede: die einen glichen einem klaren Zuckersirup, während die anderen mehr wässerig-dünnflüssig erschienen; alle enthielten eine gewisse Menge in Wasser unlöslicher, fettähnlicher Flocken, die zweifellos von lezithin- und lipoidartigen Bestandteilen des Mehls und der Kleie herrührten und durch den Alkohol mitextrahiert worden waren.

Bei der Titration wurde Fehlingsche Lösung benützt, indem das voraussichtlich nötige Quantum jedesmal aus den Merckschen volumetrischen Lösungen für Fehling, *Solutio Cupri sulfurici* und *Solutio Tartari natronati,* zu genau gleichen Teilen frisch hergestellt wurde. Wie bekannt, sind zur vollständigen Reduktion von 10 ccm Fehlingscher Lösung 0,05 g Glykose nötig; dieser Wert hat nur dann volle Gültigkeit, wenn die 0,05 g Glykose in ungefähr 10 ccm Wasser gelöst

sind, entsprechend der Menge der Fehlingschen Lösung. Wir mußten daher nach dem Resultat einer orientierenden Probetitration die vorliegende Zuckerlösung für die maßgebenden Titrationen jeweils 2-, 5-, 8- oder 10fach verdünnen, was immer mittels Pipette und Meßkölbchen mit größter Sorgfalt ausgeführt wurde; die erhaltenen Werte mußten dann entsprechend mit 2, 5, 8 oder 10 multipliziert werden.

Bekanntlich ist bei der Titration nach Fehling die Beobachtung der gänzlichen Entbläuung infolge des Suspendiertbleibens des fein verteilten Kupferoxyduls nicht immer leicht. Man kann aber, wie Herbert E. Durham (Archiv f. Hygiene Bd. 81, S. 284 Anm.) vorgeschlagen hat, den störenden Niederschlag zum größten Teil dadurch ausschalten, daß man in die Kupferlösung eine große Flocke gereinigten Asbests bringt, an den sich das beim Kochen entstehende Kupferoxydul ansetzen kann. Wir geben also mittels Pipette 10 ccm frischbereiteter Fehlingscher Lösung in ein ca. 350 ccm fassendes Erlenmeyerkölbchen, verdünnen mit 40 ccm Wasser und fügen mit Pinzette eine etwa kirschgroße lockere Asbestflocke zu. Hierauf bringen wir auf dem Drahtnetz diese Lösung zum Aufkochen, wobei wir das mit Hilfe einer Papiermanschette gefaßte Kölbchen oftmals schwenken, um ein Aufstoßen des Inhalts zu verhindern. Dann lassen wir nach bekannter Vorschrift aus einer Bürette die zu titrierende Zuckerlösung portionsweise einlaufen und kochen immer wieder auf, bis Entbläuung eingetreten ist. Die Verbesserung von Durham hat uns gute Dienste geleistet, wir haben sie durchweg angewendet. Um aber sicher zu gehen, haben wir alle Titrationen doppelt, viele sogar dreifach ausgeführt.

Der Titer der Fehlingschen Lösung (Merck) war der gebräuchliche, d. h. 100 ccm verlangten zur Entbläuung 0,5 g Glykose. Das Titrationsergebnis wurde unter Berücksichtigung der vorgenommenen Verdünnung (vgl. S. 17 u. 18) auf das Gesamtvolumen der betreffenden zuckerhaltigen Flüssigkeit umgerechnet.

Bei der Polarisation benutzten wir ein 189,4 mm langes Rohr von Schmidt & Haensch, das den Prozentgehalt für Glykose direkt abzulesen gestattet. Der abgelesene Prozentwert wurde in analoger Weise wie der gefundene Titrationswert auf

das Gesamtflüssigkeitsvolumen in Gramm berechnet und in unsern Tabellen unter der Rubrik S.R. = Rechtsdrehende Substanzen verzeichnet.

Um jedes Mißverständnis auszuschließen, betonen wir nochmals, daß wir bei der Berechnung sowohl der titrimetrischen wie der polarimetrischen Bestimmungen den Traubenzucker nur als Maßstab für die reduzierende und für die drehende Wirkung gewählt haben. In den Tabellen und im Text bedeuten also die Gramm- oder Prozentwerte von Glykose und R.S. (= Rechtsdrehende Substanzen) nicht etwa Werte von tatsächlich gefundenem Traubenzucker, sondern sie bedeuten nur, daß die einzelnen untersuchten zuckerigen Lösungen so stark reduzierten bezw. drehten, als wenn sie die angegebenen g oder % Traubenzucker enthalten hätten.

Tabelle 1.

Nr.	Kleister	Speichel	Kleie	R.S.	„Glykose“	Lösl. N.
1	220 g	—	—	0,00 g	0,05 g	
2	220 g	5 g	—	39,16 g	7,02 g	0
3	220 g	5 g	5 g roh	38,11 g	10,72 g	41,6 mg
4	220 g	5 g	5 g steril.	42,89 g	8,72 g	21,2 mg
5	220 g	—	5 g roh	22,58 g	6,86 g	42,6 mg
6	220 g	—	5 g steril.	0,33 g	0,11 g	
7	Wasser	5 g	5 g roh	1,15 g	0,97 g	
8	Wasser	5 g	5 g steril.	2,00 g	0,61 g	
9	Wasser	—	5 g roh	0,00 g	0,42 g	
10	Wasser	—	5 g steril.	0,00 g	0,04 g	

Die Tabelle 1 zeigt folgendes: Der Kleister (Nr. 1) für sich allein hat nur den sehr kleinen Wert von 0,05 g Glykose ergeben. Die geringe Zuckermenge kann von Haus aus im Mehl vorhanden gewesen sein, oder aber sie ist erst bei der Verkleisterung entstanden; für die Beurteilung der nachfolgenden Werte fällt sie nicht sehr ins Gewicht. Bei den 4 folgenden Proben sehen wir eine beträchtliche Bildung von Zucker: Speichel und rohe Kleie zusammen (Nr. 3) ergaben den höchsten Zuckerwert. Ziehen wir überdies die genannte geringe Zuckermenge des Kleisters allein und das Ergebnis der Kontrollen ab, so ergibt sich folgendes Bild:

Speichelwirkung	(2—1)	6,97 g	„Glykose“
Speichel + Kleie	(3—1—7)	9,7 „	„
Speichel + sterilisierte Kleie	(4—1—8)	8,06 „	„
Kleie roh	(5—1—9)	6,39 „	„

Wir sehen also, daß die 5 g Kleie 92 % der Wirkung von 5 g Speichel erzielen, also 1 g Kleie gleichviel Zucker aus Stärke gebildet hat wie 0,92 g Speichel. Die Zusammenwirkung von Kleie und Speichel (9,7 g) ergibt 72,6 % der Summe der beiden Einzelwirkungen (6,97 + 6,39 = 13,36 g); aber immerhin lieferten Speichel und Kleie zusammen mehr Zucker (9,7 g) als Speichel allein (6,97 g), was einem Mehr von 39,2 % entspricht. Die Zugabe der sterilen Kleie erhöht die Speichelwirkung noch, indem offenbar außer den mit der Kleie zugeführten Stärkekörnern, die durch die Sterilisation verdaulicher gemacht worden waren, wohl noch andere günstige Momente, vielleicht eine bessere Verteilung mitwirkten. Die nur aus sterilen Zusätzen gebildeten Proben 1, 6 und 10 ergeben die geringsten Zuckerwerte, während auch Probe 7 nicht ganz die Summe der Werte von 8 und 9 erreichte.

Die Polarisationswerte gehen den Titrationswerten in 4- bis 5facher Höhe im wesentlichen parallel, doch sehen wir dort, wo rohe Kleie zur Anwendung kam (Nr. 3, 5, 7 und 9) die Werte für „Rechtsdrehende Substanzen“ immer wesentlich hinter den voraussichtlichen Werten zurückbleiben. Dies Zurückbleiben der Drehung gegenüber den entsprechenden Werten bei Anwendung von Speichel möchten wir zunächst auf eine geringere Bildung der stark rechtsdrehenden Zuckervorstufen (Dextrine) zurückführen, außerdem aber könnte vielleicht auch eine Wirkung von gelösten, linksdrehenden Stickstoffverbindungen mitsprechen, d. h. von Verbindungen, die sich bei der Autolyse aus dem Kleieneiweiß gebildet hatten, zumal auch die bei Nr. 2—5 angeschlossenen Bestimmungen des Gehaltes an gelöstem Stickstoff bei 3 und 5 eine doppelt so große Menge wie bei 4 ergaben.

Die überraschend hohen Befunde, die die polarimetrische Untersuchung der klaren alkoholischen Filtrate ergab, können mit Sicherheit noch nicht in eine Summe von Komponenten aufgelöst werden; wohl aber sind wir berechtigt, ihnen folgende allgemeine Deutung zu geben.

Die diastatischen Enzyme führen bekanntlich verkleisterte Stärke durch eine Reihe von Etappen hindurch der Verzuckerung entgegen. Vom Dextrin ab sind die Lösungen dieser Zwischenstufen ausgesprochen rechtsdrehend, und die Maltose, in der Regel das letzte Glied der diastatischen Verzuckerung, hat eine mehr als doppelt so hohe spezifische Drehung wie der Traubenzucker. Daß auch in unserem Falle solche Zwischenstufen vorhanden waren, ergibt sich aus dem Ausfall der Jodproben, die wir mit kleinen alkoholfrei gemachten Mengen der Filtrate angestellt haben.

Ferner wurde das von vornherein als sicher anzunehmende Vorhandensein von Maltose durch die Darstellung des Phenyl-Maltosazons durch Herrn Professor Dr. O. Schulz in einigen Versuchen erwiesen. Eine hydrolytische Aufspaltung des wasserlöslichen Anteils der Filtrate (völlige Überführung in Glykose) haben wir nicht durchgeführt, weil wir der Meinung waren, daß sie hier für die vergleichende Betrachtung der Ergebnisse der einzelnen Versuche entbehrt werden könne.

Inwieweit schließlich bei der starken Rechtsdrehung auch noch die Gesamtheit der phosphatid- und lezithinartigen Substanzen und sonstigen organischen Verbindungen, die in das alkoholische Extrakt mit übergehen, mitwirkt, müssen wir einstweilen dahingestellt sein lassen.

Allen diesen Faktoren zusammen, insbesondere aber den stark rechtsdrehenden, der Maltose nahestehenden Vorstufen des Zuckers und der Maltose selbst schreiben wir die starke Rechtsdrehung der alkoholischen Extrakte zu. In den Tabellen haben wir sie alle unter „R.S.“ zusammengefaßt und durch die Angabe ihres „Traubenzuckerwertes“ die Summe ihrer drehenden Wirkungen gekennzeichnet.

Da der Ausfall des ganzen ersten Versuches mit anderen, im Erlanger hygienischen Institut schon zuvor gewonnenen Ergebnissen in Einklang zu bringen war und ein ganz befriedigendes Bild über die Anwesenheit eines diastatischen Fermentes in der Reiskleie wie über seine dem Speichel nahekommende Wirksamkeit ergab, so wurden weitere Versuchsreihen angeschlossen, die uns insbesondere über den Einfluß der Temperatur und der Zeit auf die diastatische Wirkung

dieser Kleie Aufschluß geben sollten. Als stärkehaltiges Substrat sollte dabei wiederum Reismehlkleister verwendet werden.

3. Die beste Temperatur für die Wirkung der Reiskleie.

Es wurden 7 tarierte, weithalsige Erlenmeyerkolben mit je 220 g sterilem Kleister genau nach den im vorigen Versuche gemachten Angaben beschickt und je in ein Wasserbad von 45°, 50°, 55°, 60°, 65° und 70° bis in den Hals eingetaucht. Als Wasserbad von 45° benutzten wir den mit einem Thermoregulator ausgestatteten Heimschen Blutserumsterilisierungsapparat (L. Heim, Lehrbuch der Bakteriologie. 4. Aufl., S. 27, Fig. 23); für die übrigen Proben wurden größere Emailletöpfe genommen, in denen die Wärme des Wassers durch aufmerksame Regulierung der Flamme auf der gewünschten Höhe gehalten werden konnte, ohne daß größere Schwankungen als etwa von 1° entstanden. Je größer die Töpfe, also je größer die Wassermenge und je höher die Temperaturen genommen werden, desto leichter gelingt die Einhaltung des gewünschten Wärmegrades. Nachdem der Kleister in den Kolben die entsprechende Temperatur erreicht hatte, wurden in Abständen von 10 Minuten in jede Probe 5 g Reiskleie (in der Form des schon beim vorigen Versuch verwendeten, hochprozentigen Reisfuttermehles) zugegeben und mittels eines beschuhten Glasstabes gründlich mit dem Kleister vermischt. Bei 45° hatten wir zwei Kolben eingestellt und den einen zur Kontrolle ohne Kleiezusatz gelassen. In alle Proben wurden noch 10 ccm Toluol gegeben. Nach 5 Stunden, von dem Zusatz der Kleie an gerechnet, wurden die Kolben in entsprechender Reihenfolge aus den Wasserbädern genommen, gewogen und das doppelte Volumen Alkohol (96%ig) zugegeben, wobei ein Überfüllen in Literflaschen nötig wurde, was mittels des zur Verfügung stehenden Alkohols genau ausgeführt werden konnte. Die weitere Verarbeitung und Berechnung erfolgte nach dem bei dem ersten Versuche angegebenen Verfahren.

Das Ergebnis dieser Versuchsreihe ist in der folgenden Tabelle 2 übersichtlich zusammengestellt.

Tabelle 2.

Kleister	Kleie	Temperatur	R.S.	„Glykose“	N gelöst
220 g	—	45°	0,14 g	Spur	
220 g	5 g	45°	9,20 g	1,77 g	12,3 mg
220 g	5 g	50°	10,18 g	1,75 g	
220 g	5 g	55°	9,07 g	1,73 g	12,2 mg
220 g	5 g	60°	6,46 g	1,19 g	
220 g	5 g	65°	1,72 g	0,43 g	3,8 mg
220 g	5 g	70°	1,10 g	0,18 g	
220 g	5 g	37°	9,30 g	1,63 g	
220 g	5 g	19°	7,30 g	1,15 g	

Die Tabelle 2 zeigt zunächst, daß in 5 Stunden, wie zu erwarten war, eine geringere Zuckermenge erhalten wurde als bei der 52stündigen Dauer des vorigen Versuches, daß aber die Werte immerhin höhere sind, als dem Verhältnis der beiden Versuchszeiten entspricht, eine Tatsache, die wir bei der nächsten Versuchsreihe noch deutlicher in Erscheinung treten sehen. Die Proben bei 45° und 50° ergeben die höchsten Werte. Bei 55° ist nur ein geringer Rückgang zu bemerken, ein größerer aber bei 60°; bei 65 und 70° sehen wir die Zuckerwerte weiterhin stark sinken. Dieses Resultat erlaubt uns folgende Schlüsse über den Einfluß der Temperatur auf das diastatische Enzym in der Kleie: Die günstigste Wirkung besteht zwischen 45 und 50°. Auch bei 55° wurde noch eine recht günstige Wirkung erzielt: bei 60°, noch mehr bei 65° sehen wir schon eine starke Hemmung, bei 70° war fast jede Wirkung aufgehoben. Die Polarisationswerte zeigten im wesentlichen das gleiche Verhältnis, der höchste Wert wurde hier bei 50° gefunden. Wenn man die „Glykose“werte nur in der zweiten Dezimale schwanken sieht, so darf man die Polarisationswerte wohl als Ergänzung dazu heranziehen und annehmen, daß das Optimum der Temperatur etwa bei 50° gelegen ist.

Um zu sehen, wie stark in der gleichen Zeit bei niedrigen Temperaturen die diastatische Wirkung ist, wurde nachträglich noch eine gleiche Probe im Brutschrank bei 37° und eine andere bei Zimmertemperatur von etwa 19° (Nr. 8 u. 9 der Tabelle 2) angesetzt. Diese Ergänzung läßt erkennen, daß bei Temperaturen unter 45° die Wirkung der Diastase mit dem Sinken der Temperatur wohl etwas nachläßt, daß aber dieser Abfall auch bei 37° noch keineswegs erheblich ist.

Wir erhielten somit aus diesem Versuch die recht breite Temperaturzone zwischen 37 und 55°, innerhalb deren die diastatischen Enzyme der Kleie eine gute Wirkung entfalten.

Die in der Tabelle beigefügten Stickstoffwerte werden später noch berücksichtigt werden. Sie stammen von Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl, die wir gelegentlich mit den von den Zuckertitrationen übriggebliebenen Proben zu unserer Orientierung ausgeführt haben.

4. Verschieden lange Fermentierung bei 37° und 50°.

Da bei den vorigen Versuchen der Kleister durch seine Dickflüssigkeit die Verteilung etwas erschwert hatte, stellten wir jetzt einen etwas dünneren her, von dem wir je 215 g, entsprechend einem Mehlgehalt von 15 g, für die einzelnen Versuchsproben in tarierte, weithalsige Literflaschen verteilten; auch verwendeten wir diesmal zum Kleister nicht das Reispudermehl, sondern das gleich aussehende feinste Reismehl von Knorr. Vier von diesen Kleisterportionen stellten wir in den Brutschrank, zwei davon in das mit dem Thermoregulator auf 50° eingestellte Wasserbad. Nachdem die Proben die gewünschte Temperatur angenommen hatten, setzten wir ihnen je 5 g Reiskleie (hochprozentiges Reisfuttermehl) zu und verteilten sie durch Umrühren, hierauf noch 10 ccm Toluol. Zur Kontrolle wurde eine Flasche mit Kleister allein und eine nur mit Kleie in wässeriger Aufschwemmung in den Brutschrank gebracht. Nach verschieden langer Dauer der Kleieeinwirkung wurden die einzelnen Versuche durch die übliche Alkoholzugabe unterbrochen und die Proben entsprechend weiter verarbeitet.

Tabelle 3.

Kleister	Kleie	Temp.	Zeit	R.S.	„Glykose“	Lösl. N.
215 g	5 g	18°	72h	17,66 g	4,33 g	
215 g	5 g	37°	6h	9,90 g	1,80 g	15,6 mg
215 g	5 g	37°	24h	16,76 g	3,97 g	
215 g	5 g	37°	48h	20,98 g	6,54 g	
215 g	5 g	37°	72h	21,05 g	6,86 g	
215 g	—	37°	72h	0,46 g	Spur	
Nur Wasser	5 g	37°	72h	0,52 g	0,38 g	
215 g	5 g	50°	6h	11,40 g	2,85 g	
215 g	5 g	50°	72h	13,50 g	4,83 g	

Betrachten wir in der Tabelle 3 zunächst die Ergebnisse bei 37°, so finden wir nach 6 Stunden schon eine ganz erhebliche Zuckermenge von 1,8 g, in 24 Stunden ist sie mehr als verdoppelt, in 48 Stunden fast vervierfacht, während nach weiteren 24 Stunden der in 48 Stunden erreichte Wert nicht mehr wesentlich überschritten wird; es nimmt also in den ersten Stunden die Zuckerbildung rasch zu, bei längerer Dauer in den gleichen Zeiten langsamer. Stärke war auch in der 72 Stunden-Probe noch reichlich in verflüssigter Form vorhanden. Da nun in den letzten 24 Stunden keine wesentliche Zunahme der Zuckermenge beobachtet werden konnte, müssen wir annehmen, daß die in den 5 g Kleie vorhandenen diastatischen Enzyme nach 48 stündiger Wirkung fast völlig erschöpft waren.

Bei 50° sehen wir, wie nach dem vorigen 5stündigen Versuch zu erwarten war, binnen 6 Stunden eine noch wesentlich größere Menge Zucker als in der gleichen Zeit bei 37° entstehen, aber offenbar wird bei dieser Temperatur die diastatische Wirkung eher und stärker geschwächt als bei 37°, so daß nach 72 Stunden noch nicht einmal das Doppelte der 6stündigen Wirkung gefunden wurde, ja auffallenderweise sogar wesentlich weniger als bei 37° in der gleichen Zeit. Bei 18° hatte sich nach 72 Stunden fast ebenso viel Zucker gebildet als bei 50° in der gleichen Zeit, und die rechtsdrehenden Substanzen waren sogar reichlicher vorhanden als in der bei 50° gehaltenen Probe.

5. Wirkung verschiedener Kleiemengen bei 37°.

Wir wollten sehen, welche Menge Kleie genügte, um bei der Temperatur von 37° und innerhalb der als günstig ermittelten Zeit von 48 Stunden eine bestimmte Menge Kleister möglichst vollständig in Zucker zu verwandeln, und wie weit geringere Kleiemengen hinter dieser Wirkung zurückblieben; nachdem wir gesehen hatten, daß die bisher angewendeten 5 g Kleie immer nur einen Teil der zur Verfügung stehenden 220 g Kleister verzuckert hatten, nahmen wir nunmehr nur etwa den vierten Teil dieser Kleistermenge und zwar 50 g Kleister, der 3,5 g Knorrs feinstes Reismehl enthielt. Auf diese 50 g ließen wir je 1, 3, 5 und 10 g Kleie in Form des hochprozentigen Reisfuttermehles unter den erwähnten Bedingungen nach Zusatz von 2 ccm Toluol einwirken. Die Aufarbeitung und die

Berechnung, die ganz wie bisher erfolgte, ergab zunächst, daß bei der Probe mit 10 g Kleie im Filterrückstand immer noch Teile zu finden waren, die von dem Kleister herstammten, so daß also offenbar 10 g Kleie nicht vermocht hatten, alle Kleisterteilchen vollständig aufzulösen. Die für Glykose erhaltenen Werte steigen zwar entsprechend dem größeren Kleiezusatz an, jedoch keineswegs proportional den angewendeten Kleiemengen.

Tabelle 4.

50 g Kleister aus Knorrs feinstem Reismehl.

Kleie	R.S.	„Glykose“
1 g	4,77 g	1,365 g
3 g	4,95 g	1,950 g
5 g	4,725 g	2,255 g
10 g	4,77 g	2,820 g

Die Polarisationswerte waren merkwürdigerweise bei allen 4 Proben gleich hoch; vielleicht läßt sich dies damit erklären, daß aus der größeren Menge Kleie auch in vermehrtem Maße N-haltige Substanzen in Lösung gegangen waren, die durch ihre linksdrehende Wirkung das durch den höheren Zuckergehalt bedingte Mehr an Rechtsdrehung aufhoben.

Um diese Ergebnisse noch etwas auszubauen und eine völlige Verflüssigung des Kleisters zu erzielen, stellten wir eine zweite kleine Versuchsreihe mit 4 Proben von je 50 g Kleister an, diesmal aus Reispudermehl (ebenfalls 3,5 g); es wurden $^1/_2$, 1, 5 und 15 g von der gleichen Kleie zugesetzt.

Tabelle 5.

50 g Kleister aus Reispudermehl.

Kleie	R S.	„Glykose“
$^1/_2$ g	4,455 g	0,974 g
1 g	5,33 g	1,409 g
5 g	5,60 g	2,640 g
15 g	5,60 g	3,540 g

Hier hatten die 15 g Kleie den Kleister so gut wie vollkommen abgebaut, wie es das Aussehen des Filterrückstandes und der erhaltene Zuckerwert erkennen ließen, so daß also ungefähr 4 g Kleie nötig sind, um 1 g Mehl unter Bedingungen wie im

vorliegenden Versuch völlig zu verzuckern. Im wesentlichen sind die Werte mit denen der ersten Reihe (Tabelle 4) gleichsinnig ausgefallen; doch scheint der Wechsel der Mehlart nicht ganz gleichgültig gewesen zu sein, weil bei dem Reispudermehl (Tabelle 5) der mit 5 g Kleiezusatz erhaltene Zuckerwert über den beim Knorrschen Reismehl erhaltenen hinausgeht. Für die Polarisation, die ebenfalls bei dem Reispudermehl etwas höhere Werte ergab, mag die oben ausgesprochene Anschauung gelten.

6. Wirkung verschiedener Kleiepräparate auf Reismehlkleister und auf sich selbst bei 37°.

Da wir bisher fast ausschließlich das hochprozentige Reisfuttermehl zu unseren Untersuchungen über die diastatischen Enzyme in der Kleie benützt hatten, sollte ein weiterer Versuch zeigen, welche diastatischen Fermentwirkungen von den andern uns zur Verfügung stehenden Präparaten ausgeübt würden. Es kamen für uns die nachstehenden Präparate (vgl. Futtermittelbuch S. 13) in Betracht, von denen wir zunächst eine kleine Menge auf einen Objektträger streuten, mit 2 bis 3 Tropfen Jodjodkaliumlösung (1 : 2 : 300) vermischten und nach Auflegen eines Deckglases mit Leitz 3 und 7 untersuchten.

1. Hochprozentiges Reisfuttermehl (siehe Futtermittelbuch Nr. 1). Makr.: ziemlich reichlich blaue Stellen. Mikr.: kleine bis mittelgroße Kleienteile, vermischt oder bedeckt mit Stärkekörnern und Klümpchen von Stärke.
2. Reisfuttermehl von den ersten Schälgängen abfallend (Futtermittelbuch Nr. 1). Makr.: weniger blau als das nächstfolgende. Mikr.: Stärkekörner teils einzeln, meist in Klumpen. Reichliche Kleienteile von mittlerer Größe und einzelne große.
3. Reisfuttermehl von der Stärkefabrikation abfallend (Futtermittelbuch Nr. 3). Makr.: ganz blau. Mikr.: Stärke in einzelnen Körnern und in größeren und kleineren Klumpen. Kleienteilchen ganz vereinzelt und klein.
4. Reisfuttermehl vom 3. bis 4. Schälgang abfallend (Futtermittelbuch Nr. 3). Makr.: reichlich blau. Mikr.: viel Stärke in Körnern und Klumpen, dazwischen feingemahlene Kleienteilchen.

5. Gewalzte Reiskleie (siehe Futtermittelbuch). Makr.: vereinzelte blaue Klümpchen, grobe Spelzenteile. Mikr.: vereinzelte Stärkekörnchen und Klümpchen, namentlich an den Spelzenteilen hängend.
6. Gemahlene Reiskleie. Makr.: grobe Kleie, mit Jod keine Blaufärbung. Mikr.: einzelne Stärkekörnchen, manchmal an den Spelzenteilen.
7. Reispudermehl. Makr.: ganz blau. Mikr.: fast ausschließlich Stärke, dazwischen vereinzelte Schalenteilchen und Aleuron (mit Jod rot). (Ähnlich sah auch Knorrs feinstes Reismehl aus.)

Von jedem der 6 erstgenannten Präparate nahmen wir 5 g und ließen sie unter den gleichen Bedingungen wie bei unserm ersten Versuch, nämlich bei 37°, 72 Stunden lang auf je 220 g Kleister, hergestellt mit 20 g Reispudermehl, einwirken. Ferner wurden je 25 g unter den gleichen Bedingungen in 220 g Wasser der Autolyse unterworfen.

Tabelle 6.

Kleie (Rfm. = Reisfuttermehl)	A. 220 g Kleister mit 20 g Reispudermehl und 5 g Kleie		B. 220 g Wasser mit 25 g Kleie	
	R.S.	„Glykose“	R.S.	„Glykose“
1. Rfm. hochprozentiges	22,3 g	6,916 g	2,69 g	2,518 g
2. Rfm. v. 1. Schälgang	18,0 g	5,524 g	2,36 g	2,465 g
3. Rfm. v. d. Stärkefabrikation	18,5 g	4,828 g	2,07 g	1,707 g
4. Rfm. v. 3.—4. Schälgang	15,6 g	3,770 g	4,06 g	3,699 g
5. Gewalzte Kleie	3,43 g	0,924 g	0,27 g	0,431 g
6. Gemahlene Kleie	1,84 g	0,574 g	0,27 g	0,308 g
Kleister ohne Kleie	0,58 g	Spur	—	—

Bei der Verarbeitung zeigten die alkoholisch-wässerigen Filtrate der Proben mit Reiskleie (B 5 und B 6 der Tabelle 6) eine tiefbraungelbe Färbung, die die Polarisation erschwerte; beim Eindampfen hinterließen sie an der Wand der Porzellanschale einen braunen Farbstoff. Die Abdampfrückstände hatten teilweise, insbesondere bei B 1—4, einen angenehmen, würzigen, karamelartigen Geruch. Der getrocknete Filterrückstand von Probe B 5 und B 6 sah fast ebenso aus wie die Kleie vor der Autolyse, doch schienen die einzelnen Spelzenteilchen der Kleie etwas weicher geworden zu sein.

Vergleichen wir die Endwerte in unserer Tabelle 6, so ergab wieder der Kleister für sich allein eine nur ganz geringe Zuckermenge, so daß eine genaue Fehlingtitration nicht möglich war. Gering sind auch die von der gewalzten und der gemahlenen Reiskleie auf Kleister erzielten Wirkungen sowie die bei ihrer Autolyse (Probe B 5 und B 6) entstandenen Zuckermengen. Diese Präparate (gemahlene und gewalzte Reiskleie) bestehen fast nur aus den äußersten zellulosereichsten Teilen des Reiskornes, sie enthalten dem Futtermittelbuch wie der mikroskopischen Untersuchung zufolge fast nur Spelzen. Wesentlich wirksamer sind die Kleienteile, die hauptsächlich die äußeren Schichten des Kornes selbst enthalten. Die unter dem Namen Reisfuttermehl in den Handel kommenden Präparate zeigen die amylolytische Wirkung in recht verschiedener Stärke, was auf einen verschiedenen Fermentgehalt schließen läßt. Nach ihrer Wirksamkeit wurden sie in der Tabelle 6 geordnet. Auffallenderweise stimmte die Reihenfolge nicht mehr, als die betreffenden Kleien der Autolyse in Wasser unterworfen wurden. B 4, „Reisfuttermehl des 3. und 4. Schälganges“ fällt aus der Reihe; eine genügende Erklärung dafür können wir vorläufig nicht geben.

II. Proteolytische Enzyme in der Reiskleie.

1. Allgemeine Bemerkungen.

Für den Nachweis der proteolytischen Fermente und die quantitative Bestimmung ihrer Wirkung verfügten wir infolge der Schwierigkeit, die Eiweißspaltprodukte voneinander zu trennen, über keine Methode, die so rasch zum Ziel geführt hätte wie die Zuckerbestimmung beim Abbau der Stärke. Bei der Eiweißspaltung entstehen Stoffe, die sich je nach der Abbaustufe durch Löslichkeit, Gerinnungsfähigkeit, Fällbarkeit, Dialysierbarkeit, Farbenreaktion unterscheiden. Zur quantitativen Messung der Eiweißverdauung entschieden wir uns für ein Verfahren, das sich auf die Fällbarkeit bezw. Nichtfällbarkeit der stickstoffhaltigen Substanzen vor und nach der Enzymwirkung gründet. Wenn wir die Summe der durch Proteolyse entstandenen leichtlöslichen Eiweißspaltprodukte der Kürze halber als „gelösten“ oder „löslichen“ Stickstoff bezeichnen, so können wir auch sagen, das Verfahren gründe sich auf die Trennung

des gelösten vom ungelösten Stickstoff. Zur Ausfällung des ungelösten Stickstoffs, d. i. also der unveränderten oder wenig abgebauten Stickstoffsubstanzen, standen eine große Zahl von Agenzien zur Verfügung, wie Gerbsäure, Phosphorwolframsäure, Trichloressigsäure, Sulfate u. a.; alle diese geben natürlich keine einheitlichen Werte, da die zahlreichen Abbaustufen den einzelnen Fällungsmitteln gegenüber eine verschiedene Löslichkeit aufweisen. Weis[1]) z. B., der Gerbsäure benützt hatte, erklärt den Unterschied im Ausfall seiner Versuche über das Wärmeoptimum für proteolytische Enzyme gegenüber den Versuchen von Kjeldahl, der Kupfersulfat nahm, folgendermaßen: „Ein bestimmtes Fällungsmittel enthüllt nur eine bestimmte Phase der Enzymwirkung; vielleicht wird der größte Teil der Produkte, die sich nicht mit Kupfersulfat ausfällen lassen, bei 50,5—55° gebildet werden; während bei 47—48° die meisten der Stoffe entstehen, welche nicht durch Gerbsäure ausgefällt werden."

Um vergleichbare Werte zu erhalten, mußten wir unsere Versuche mit ein und demselben Mittel durchführen. Wir verwendeten wie bei den Versuchen über das diastatische Enzym zur Fällung 96%igen Alkohol, von dem wir das doppelte Volumen der zu untersuchenden Flüssigkeit zufügten, so daß sich ein Alkoholgehalt von rund 64% ergab. Durch eine derartige Alkoholkonzentration werden hauptsächlich die Eiweißstoffe und deren Spaltprodukte bis zu den Peptonen ausgefällt, während weitere Abbauprodukte ungefähr von den Peptonen an abwärts in Lösung bleiben.

Als Substrat, an dem sich die Wirkung der proteolytischen Enzyme des Reiskorns zeigen sollte, wählten wir zunächst das „hochprozentige Reisfuttermehl" selbst. Lufttrocken untersucht, enthält diese Kleie (s. den folgenden Abschnitt) 1,68% N, d. h. rund $1{,}68 \times 6{,}25 = 10{,}5\%$ Proteinstoffe. Bei einem solchen Proteingehalt mußten sich eingreifende Abbauprozesse analytisch sicher nachweisen lassen.

Zur Hintanhaltung von Bakterienentwicklung nahmen wir auch hier Toluol zu Hilfe, überließen die Proben bei den verschiedenen Temperaturen der Enzymwirkung und führten nach

[1]) Fr. Weis, Über das proteolytische und ein eiweißkoagulierendes Enzym in keimender Gerste (Malz). Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 79. 1900.

der Zugabe von Alkohol die Polarisation und die Bestimmung der Abbauprodukte, hier des Stickstoffs nach Kjeldahl, aus.

2. Bestimmung des Stickstoffgehaltes der Reiskleie.

Von dem lufttrockenen „hochprozentigen Reisfuttermehl“ wurden 2 mal 5 g abgewogen und nach Zusatz von Kupfersulfat mit etwa 40 ccm phosphorpentoxydhaltiger Schwefelsäure im Kjeldahlkolben aufgeschlossen. Dies ging bei $1^1/_2$- bis 2 stündigem Erhitzen glatt von statten; bei der Verdünnung des Rückstandes zeigte sich ein weißes, feinkörniges, unlösliches Sediment (Kieselsäure?). Der Kjehldahlkolben aus Jenaer Glas — wir benutzten durchweg solche von $^3/_4$ l Inhalt — wurde dann in den Destillierapparat eingeschaltet, d. h. mit dem Stopfen verschlossen, durch den die mit Glashahn versehene Trichterröhre für den Zufluß der Natronlauge, ferner das zuführende Rohr für den Wasserdampf und das abführende für das frei werdende Ammoniak ging. Das Ableitungsrohr trug einen Kühler und mündete ohne Zwischenstücke in den mit 25 ccm Normal-Schwefelsäure beschickten vorgelegten Erlenmeyerkolben. Die Dampfdurchleitung wurde eingestellt, wenn ein Streifen rotes Lackmuspapier keine Farbenänderung mehr durch das Destillat erfuhr. Bei der Titration nahmen wir Kongorot als Indikator, das uns bei vergleichenden Versuchen mehr zusagte als Lackmus.

Die Titerdifferenz, mit dem Atomgewicht des Stickstoffs = 14 multipliziert, ergibt den Stickstoffgehalt der analysierten Substanz in mg. Wir hatten zur Neutralisation der aus den 5 g Kleie erhaltenen Kjeldahldestillate in beiden Analysen genau übereinstimmend 19,0 n-NaOH gebraucht und berechneten daraus ($25 - 19 = 6$; $6 \times 14 = 84$) einen N-Gehalt von 84 mg für 5 g hochprozentiges Reisfuttermehl.

Da wir erwarten mußten, daß nur ein Teil der N-Substanzen bei der Autolyse der Kleie in Lösung gehen würde, hätten die 5 g Kleie als Ausgangsmaterial recht kleine N-Werte ergeben, bei denen die unvermeidlichen analytischen Fehler recht erheblich ins Gewicht gefallen wären; wir wählten daher immer 25 g unseres hochprozentigen Reisfuttermehls, die also 420 mg N enthielten, zu den Autolyseversuchen.

3. Bestimmung des Stickstoffgehaltes des alkoholischen Auszugs aus der unveränderten und aus der gekochten Reiskleie.

Wenn wir für die diastatischen Versuche in dem Reiskleister ein Material besessen hatten, das, selbst fast zuckerfrei, immerhin kleine Enzymwirkungen erkennen ließ, so mußten wir auch bei den proteolytischen Versuchen dem Umstande Rechnung tragen, daß in der Kleie jedenfalls schon von vornherein mit 66 %igem Alkohol extrahierbare N-Substanzen vorhanden waren, und daß bei den verschiedenen Temperaturen sich deren Menge noch ändern konnte.

Um uns darüber Klarheit zu verschaffen, haben wir zunächst die Reiskleie für sich untersucht. Es wurden zwei Portionen 25 g Kleie mit je 300 ccm 66 %igen Alkohols übergossen und nach 24stündigem Extrahieren im Brutschrank die in den $^2/_3$-Alkohol übergegangene Stickstoffmenge bestimmt, indem, gleich dem Verfahren bei den amylolytischen Versuchen, ein durch Filtration gewonnener, abgemessener Teil des bekannten Gesamtvolumens auf dem Wasserbade eingedampft und hierauf sein Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt wurde. Die Berechnung des Wertes auf das Gesamtvolumen ergab, daß von den 420 mg Kleien-N (aus 25 g Kleie) von vornherein 21 mg = 5% in Verbindungen enthalten waren, die sich in 66 %igem Alkohol lösten. Ein gleicher Versuch wurde mit Kleie angestellt, die mit kochendem Wasser übergossen und $^1/_2$ Stunde im strömenden Dampf gehalten worden war. Aus 25 g solcher Kleie erhielten wir 31,3 mg, d. i. 7,4 % vom Gesamtstickstoff. Es wird also bei der Einwirkung kochenden Wassers die Löslichkeit des Kleienstickstoffs in 66 %igem Alkohol etwas vermehrt, und wir können annehmen, daß bei den dazwischen liegenden Temperaturen die Löslichkeit des Kleienstickstoffs an und für sich zwischen den Werten $^1/_{20}$ und $^1/_{13}$ des gesamten N-Gehaltes schwanken wird. Finden wir nun aber, daß aus der Kleie, wenn wir sie bei mittleren Temperaturen einige Zeit in feuchtem Zustande der Autolyse überlassen, wesentlich größere Stickstoffmengen in Lösung gehen, und besonders, daß die höchsten Werte bei den für die Fermente günstigsten Temperaturen erzielt werden, so können wir daraus schließen, daß dies der Wirkung eines in der Kleie vorhandenen proteolytischen Enzyms zuzuschreiben ist.

4. Wirkung auf pflanzliches Eiweiß.

a) Wirkung auf das Eiweiß der Kleie selbst bei verschiedenen Temperaturen.

Wir stellten zunächst folgende Versuchsreihe an: In 10 tarierte weithalsige Halbliter-Kolben wurden 200 ccm destillierten Wassers eingefüllt. Dann wurden die Kolben konstant bei einer bestimmten Temperatur erhalten, und zwar bei 18° durch Stehenlassen im Zimmer, bei 37° im Brutschrank, bei 45° im Heimschen Blutserumsterilisierungsapparat, bei 50, 55, 60, 65 und 70° in entsprechenden unter Kontrolle gehaltenen Wasserbädern. War in dem Inhalt der Kolben die gewünschte Temperatur erreicht, so gaben wir in jeden 25 g des hochprozentigen Reisfuttermehls und verteilten die Kleie durch Umrühren in dem Wasser; bis 60° erhielten die Kolben noch 10 ccm Toluol, bei höheren Temperaturen nicht mehr, weil ein Bakterienwachstum dabei nicht zu befürchten war. Nach 6 bezw. 12 Stunden wurde die Fermentwirkung durch Zugabe des doppelten Volumens Alkohol abgebrochen und der gelöste Stickstoff bestimmt.

Wir schlossen auch bei den Eiweißverdauungsversuchen die wenig Zeit in Anspruch nehmende polarimetrische Untersuchung des Filtrates an und führen des Interesses halber die hier gefundenen Werte für R.S. in den Tabellen mit auf; irgendwelche Schlüsse auf den Eiweißabbau lassen sich jedoch aus ihnen nicht ziehen.

Tabelle 7.

Gesamtstickstoffgehalt in 25 g Reiskleie (hochprozentiges Reisfuttermehl): 420 mg = 1,68 % N.

25 g dieser Kleie, in 200 ccm Wasser aufgeschwemmt, lieferten

bei	in Std.	R.S.	gelösten N	= % N
18°	12h	1,20 g	30,0 mg	0,12 %
37°	12h	1,21 g	35,8 mg	0,14 %
45°	12h	1,31 g	58,8 mg	0,23 %
50°	12h	1,57 g	60,3 mg	0,24 %
55°	12h	1,81 g	61,4 mg	0,25 %
60°	12h	1,95 g	58,2 mg	0,23 %
65°	12h	1,34 g	54,2 mg	0,22 %
70°	12h	0,65 g	51,8 mg	0,20 %
45°	6h	1,33 g	52,1 mg	0,21 %
50°	6h	1,45 g	54,4 mg	0,22 %
100°	$^1/_2$h	0,34 g	31,3 mg	0,125 %

25 g dieser Kleie, ohne weiteres mit $^2/_3$-Alkohol extrahiert, ergaben 0,60 g 21,0 mg 0,085%.

Die erhaltenen Stickstoffwerte, wie sie die Tabelle 7 zeigt, geben ein eindeutiges Bild, und wir müssen nach der vorausgegangenen Überlegung das Anwachsen des gelösten Stickstoffes bis zu der Temperatur von 55° und das allmähliche Wiederabnehmen bei höheren Temperaturen der Wirkung eines proteolytischen Fermentes in der Kleie zuschreiben, das sein Wärmeoptimum bei ca. 55° hat. Bei dieser Temperatur waren etwas mehr als 10% von dem in 65%igem Alkohol nicht löslichem Stickstoff, der sich nach der ersten und letzten Zeile der Tabelle 7 auf 420—21 = 399 mg berechnet, in lösliche stickstoffhaltige Abbauprodukte umgewandelt worden.

Die bei 45 und 50° in 6 Stunden erhaltenen Mengen von gelöstem N erreichen fast die von 12 Stunden, es wird also auch von den proteolytischen Fermenten die Hauptwirkung in den ersten Stunden erzielt.

Zur Ergänzung dieser Befunde wurde noch eine weitere Versuchsreihe angeschlossen, die in einer besonderen Tabelle 8 zusammengestellt ist, weil wir aus äußeren Gründen dazu ein anderes Kleiepräparat nehmen mußten. Wir haben das dem ersten sehr ähnliche „von den ersten Schälgängen abfallende Reisfuttermehl" gewählt. Es kommt mit dem von uns ermittelten Stickstoffgehalt von 1,48% dem „hochprozentigen Reisfuttermehl" ziemlich nahe.

Tabelle 8.

Gesamtstickstoffgehalt in 25 g Reiskleie („Reisfuttermehl vom 1.—2. Schälgange abfallend"): 371 mg = 1,48% N.

25 g dieser Kleie, in 200 ccm Wasser aufgeschwemmt, lieferten

bei	in Std.	R.S.	gelösten N	=	% N
65°	12h	0,86 g	55,9 mg		0,22%
70°	12h	0,74 g	53,6 mg		0,21%
80°	12h	0,28 g	43,0 mg		0,17%
65°	6h	0,97 g	53,8 mg		0,21%
70°	6h	0,52 g	43,6 mg		0,17%
80°	6h	0,39 g	38,2 mg		0,15%
100°	20 Min.	1,06 g	33,6 mg		0,13%

Zuerst wurden 25 g davon in einer Porzellanschale mit 200 ccm destillierten Wassers 20 Minuten lang gekocht und nach dem Abkühlen mit dem doppelten Volum 96%igen Alkohols versetzt. Auf diese Weise erhielten wir 33,6 mg Stickstoff aus der Kleie in Lösung (in dem vorigen Versuch waren nach der $^1/_2$stündigen Dämpfung 31,3 mg N gefunden worden).

Ferner haben wir je 25 g Kleie der Autolyse bei 65, 70 und 80° unterworfen und die Fermentation teils nach 6, teils nach 12 Stunden durch Alkohol abgebrochen.

Die in Tabelle 8 niedergelegten Ergebnisse dieser Versuchsreihe decken sich recht gut mit denen der Tabelle 7, nur scheint bei diesem Reisfuttermehl, wenigstens bei den angewendeten höheren Temperaturen, die Löslichkeit der Stickstoffsubstanz etwas größer zu sein als bei dem hochprozentigen Reisfuttermehl.

Freilich können wir die Tatsache, daß bei diesen recht hohen Temperaturen noch eine Zunahme an löslichen N-Substanzen stattfindet, nicht als Beweis für eine Fermentwirkung betrachten, sondern müssen vielmehr die Frage offen lassen, ob nicht vielleicht durch die mehrstündige Einwirkung von 65, 70 und 80° an sich teilweise eine Lösung und Spaltung der Proteinsubstanzen der Reiskleie eingetreten ist; auch könnten die Fermente während und gleich nach der Zugabe der Kleie zu dem vorgewärmten Wasser noch eine kurz dauernde Wirkung entfaltet haben, wogegen sie nach kurzer Einwirkung der für Fermente schädlichen Temperaturen zerstört wurden.

Gleich den 6stündig bei 45 und 50° digerierten Proben des vorigen Versuches haben auch hier die Stickstoffwerte nach 6stündiger Digestionsdauer die nach 12stündiger fast erreicht.

b) Einfluß verschiedener Reaktion.

Wir hatten schon einige Male in den Abdampfrückständen bei autolytischen Versuchen mit der Kleie eine schwach saure Reaktion beobachtet, aber sie bei ihrem geringen Grade nicht weiter berücksichtigt. In einem besonderen Versuche wollten wir nun das Verhalten der proteolytischen Fermente sowohl bei einer sauren wie bei einer alkalischen Reaktion von 0,2 % HCl bezw. 0,2 % NaOH, also ungefähr entsprechend der im

menschlichen Magen bezw. Darm[1]) im Durchschnitt vorhandenen, prüfen. Zu dem Ende wurden wieder je 25 g hochprozentiges Reisfuttermehl bei Temperaturen von 37, 45 und 55° der Autolyse unterworfen, und zwar diesmal $8^1/_2$ Stunden lang. Außer der Kleie wurden noch jeder Probe 0,5 g Kochsalz und so viel Normal-Salzsäure bezw. Normal-Natronlauge zugesetzt, daß mit dem vorhandenen Wasser eine 0,2 %ige Salzsäure bezw. 0,2 %ige Natronlauge entstand, also ein Säure- und Alkaleszenzgrad, wie er in der Regel bei der künstlichen Pepsin- bezw. Trypsinverdauung innegehalten wird. Eine Neutralisierung vor der Alkoholzugabe haben wir unterlassen.

Tabelle 9.

25 g Kleie, aufgeschwemmt in 250 ccm 0,2 %iger Kochsalzlösung, lieferten nach $8^1/_2$ stündiger Autolyse bei Gegenwart von

	0,2 % HCl		0,2 % NaOH	
bei	R.S.	mg N	R.S.	mg N
37°	1,18 %	70,66 = 0,28 % N	1,85	56,53 = 0,23 % N
45°	1,34 %	98.93 = 0,39 % N	2,19	70,66 = 0,28 % N
55°	1,35 %	100,80 = 0,40 % N	2,25	73,50 = 0,29 % N

Wie die Tabelle 9 zeigt, wurden aus den mit Säure angesetzten Proben bei den gleichen Temperaturen jedesmal höhere Werte erhalten als aus den mit Lauge angesetzten. Von 37° bis 45° ist der Zuwachs an gelöstem Stickstoff verhältnismäßig beträchtlich, von 45 bis 55° dagegen nur noch sehr gering. Vergleichen wir die Werte mit den bei neutraler Reaktion gefundenen (Tabelle 7, wo es sich allerdings um 6- und 12stündige Autolyse handelt), so ist im vorliegenden Falle bei saurer Reaktion eine Vermehrung des löslichen Stickstoffs ganz offenbar, und wir können mit gutem Grund annehmen, daß hier eine Förderung der Wirkung proteolytischer Fermente vorliegt. Auch bei alkalischer Reaktion ist der Wert für gelösten Stickstoff höher als bei neutraler, doch möchten wir diese Steigerung nicht ohne weiteres auf Rechnung einer verbesserten Fermentwirkung setzen, weil sie doch nur gering ist und durch den Kochsalz- und Alkalizusatz allein hervorgerufen sein kann. Es mag hier beiläufig darauf

[1]) Nach neueren Analysen ist der HCl-Gehalt des Magensaftes vom Menschen durchschnittlich = 0,4–0,5 % und die Alkaleszenz des Darmsaftes durchschnittlich = 0,21–0,35 % Na_2CO_3.

hingewiesen sein, daß nach Wohlgemuth[1]) die diastatische Kraft des Speichels durch Kochsalz um das Zehnfache erhöht wird.

Bei der Untersuchung der proteolytischen Enzyme von Hafer kam R. Giessen (s. S. 8) zu dem Ergebnis, daß sie bei alkalischer Reaktion am wirksamsten seien. Demgegenüber fielen unsere Versuche mit Reisenzymen in dem Sinne von Aron und Klempin (s. S. 8) aus, wonach die beste Wirkung bei saurer Reaktion eintritt. Ferner sahen wir ebenfalls nur einen Bruchteil des vorhandenen Eiweißes in Lösung gehen; während aber die genannten beiden Autoren nach 6 Stunden keine weitere Veränderung mehr feststellen konnten, haben wir, wie die Tabellen 7 und 8 zeigen, einen, wenn auch mäßigen Fortgang der Proteolyse bis zu 12 Stunden beobachten können.

5. Wirkung auf tierisches Eiweiß.

Um zu erfahren, ob die in der Reiskleie vorhandenen Fermente nicht bloß das eigene, pflanzliche, sondern auch tierisches Eiweiß abzubauen vermögen, wählten wir einen Eiweißschlamm aus Hühnereiweiß, der besonders deshalb geeignet erschien, weil aus ihm, wie die entsprechenden Kontrollversuche ergaben, durch $^2/_3$-Alkohol keine Spur von Stickstoffsubstanzen extrahiert werden kann, und weil er ein gleichmäßiges, feinflockiges Gefüge hat, das den Fermenten eine große Angriffsfläche bietet. Ich danke es Herrn Professor Dr. O. Schulz, daß er mich auf dieses Versuchsmaterial aufmerksam gemacht und mich wie bei den übrigen Methoden, so auch bei der Herstellung dieses für proteolytische Versuche ausgezeichnet brauchbaren Substrates angeleitet hat. Nachstehend soll sein Verfahren zur Herstellung von 14 Eiweißschlammproben, wie wir sie in dieser Versuchsreihe benützten, kurz geschildert werden.

Von 28 möglichst frischen Hühnereiern wurde in der üblichen Weise das Eierweiß vom Dotter getrennt, durch eine doppelte Lage feinen Musselins durchgedrückt und so von den Chalazen und Eiweißhäuten befreit; die dadurch erhaltenen 728 g Eierklar, d. i. durchschnittlich 26 g von jedem Ei, wurden auf 2800 g mit destilliertem Wasser aufgefüllt; dabei trat alsbald eine geringfügige feinflockige Eiweißfällung auf, bestehend aus

[1]) J. Wohlgemuth, Untersuchungen über Diastasen. Biochem. Zeitschr. Bd. 9, S. 10 (1908).

Globulin, das, wie schon C. G. Lehmann angegeben hat, aus der durch die Wasserzugabe verdünnten Salzlösung ausfällt. Von diesem Wasser-Eiweißgemisch maßen wir 14 mal je 200 g, also eine ungefähr 2 Eiern entsprechende Menge, ab, wobei wir zugleich darauf achteten, daß das feinflockige Globulin durch Aufschütteln auf alle sich ergebenden 14 Teile gleichmäßig verteilt wurden.

Die nachherige Ausfällung des Eiweißes erfolgte bei jedem Teile für sich. Würden wir, um Zeit und Mühe zu sparen, das gesamte Eiweiß aus den 2800 g der Eierklarlösung ungeteilt in Eiweißschlamm übergeführt haben, so hätte sich ein quantitatives Abteilen aus der Gesamtfällung nicht mehr so genau ermöglichen lassen. Wir gaben jedesmal in ein Literbecherglas 250 ccm destilliertes Wasser, brachten es durch zugeleiteten Dampf zum Kochen und gossen dann unter beständigem Umrühren eine abgeteilte Portion der Eiweißlösung in ganz dünnem Strahl hinein. Es hat sich dabei als notwendig herausgestellt, das Wasser anzusäuern; sehr günstig erwies sich dazu Essigsäure; wir erzielten eine sehr schöne außerordentlich feine Ausfällung des Eiweißes, wenn wir das Wasser im Becherglase (250 ccm) mit 8 ccm 5 %iger Essigsäure ansäuerten und durch stete Zuleitung eines kräftigen Dampfstromes tüchtig im Kochen erhielten. Ist die Ausfällung zu Eiweißschlamm beendigt, so klärt sich die übrige Flüssigkeit schnell und vollständig. Die Fällungen blieben in den Bechergläsern 2 Stunden stehen, dann wurde jeder Eiweißniederschlag auf ein glattes, hinreichend großes Filter unter Vermeidung jeglichen Verlustes übergespült, durch Filtrieren von dem überflüssigen Wasser befreit und noch mit destillierten Wasser nachgewaschen, bis das vom Filter abtropfende Wasser gänzlich säurefrei war; eine Eiweißreaktion (mit Essigsäure + Ferrozyankalium) gab das Filtrat überhaupt nicht oder nur äußerst schwach. 14 solche gewaschene Eiweißniederschläge wurden nun mit Hilfe der Spritzflasche in ebensoviele weithalsige Flaschen von 500 ccm Rauminhalt, die vorher tariert waren, mit Hilfe eines weiten Trichters übergespült und die Flaschen bis zum Inhaltsgewicht von je 200 g mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Wir versetzten zunächst 6 dieser Eiweißschlammproben mit je 0,5 g Kochsalz und je 5 g roher Kleie (hochprozentiges Reis-

futtermehl) und hielten diese Mischungen im Wasserbade bei verschiedenen Temperaturen; bei 50° stellten wir noch eine weitere Eiweißschlammprobe ein, die statt der rohen 5 g sterile Kleie als Zusatz erhalten hatte. Sämtlichen Proben wurden 10 ccm Toluol zugegeben. Während der Digestion, die $9^1/_2$ Stunden dauerte, wurden die Mischungen von Zeit zu Zeit mit einem Glasstab umgerührt. Nach Verlauf dieser Zeit brachen wir die Digestion ab, versetzten die Flascheninhalte mit dem doppelten Volumen Alkohol, was ein Überspülen in Literflaschen nötig machte, und arbeiteten sie in der früher geschilderten Weise auf.

Tabelle 10.

52 g Eiereiweißschlamm, d. i. das Eiweiß von 2 Hühnereiern, in 250 ccm 0,2 %iger Kochsalzlösung verteilt, lieferten mit 5 g roher Kleie in $9^1/_2$ Stunden

	bei	N gelöst	Polarisation
	37°	24,32	0
	45°	24,32	0
	50°	31,07	0
	55°	28,37	0
	60°	31,07	0
	65°	40,53	0
mit 5 g sterilisierter Kleie	50°	30,10	0
ohne Kleiezusatz in 8 Stunden	37°	0,0	0
mit 0,2 % HCl in 8 Std.	37°	6,47	r. 0,77°
mit 0,2 % HCl in 8 Std.	50°	7,50	r. 0,38°
mit 0,2 % NaOH in 8 Std.	37°	—	—
mit 0,2 % NaOH in 8 Std.	50°	—	l. 0,28°

Als Kontrollen und zugleich zur Prüfung des Verhaltens des Eiweißschlammes lediglich bei schwach saurer und schwach alkalischer Reaktion ohne Kleiezusatz wurden noch die in der Tabelle 10 aufgeführten weiteren Proben aufgestellt und diesmal nach 8 Stunden mit dem doppelten Volum Alkohol versetzt. Das Ansäuern bezw. Alkalisieren bis zu 0,2 % HCl bezw. 0,2 % NaOH geschah durch einen entsprechenden Zusatz von Normallösungen. In den alkalisierten Proben zeigte sich wenige Minuten nach dem Laugezusatz eine glasige, gallertige Quellung des Eiweißes, nach längerer Zeit wurden die Proben dünn-

flüssiger, durchscheinender, und bei 50° war schließlich in der opaleszierenden Flüssigkeit überhaupt keine Spur der Eiweißflocken mehr zu sehen; offenbar hatte sich, wie das ja zu erwarten war, ein Alkalialbuminat gebildet. Durch Abfiltrieren bei der letzten Probe konnten wir bei ihrer kolloidalen Beschaffenheit nur so viel Flüssigkeit bekommen, daß die Polarisation eben noch möglich war, die eine Linksdrehung von 0,28° ergab. Zur vorläufigen Orientierung über das Vorhandensein von Eiweißspaltprodukten in den alkoholisch-wässerigen Lösungen diente die Biuretreaktion. Die mit 0,2% Lauge bei 37° angesetzte Probe enthielt nur noch geringe Mengen Eiweißflocken; der weitaus größte Teil war bei der Digestion in Lösung gegangen, und auch nach Zusatz des doppelten Volumens 96%igen Alkohols entstand kein starker Eiweißniederschlag mehr, sondern nur eine unbedeutende, feinflockige Fällung. Die Gesamtflüssigkeit erschien schwach opaleszierend. Die Biuretreaktion der wässerig-alkoholischen Lösung zeigte eine rotviolette Farbe; eine weitere Aufarbeitung der alkoholisch-wässerigen Flüssigkeit konnte wegfallen, weil das Eiweiß durch das Alkali so weit gelöst und verändert worden war, daß eine Trennung in einen alkohollöslichen und einen alkoholunlöslichen Bestandteil nicht mehr in Betracht kam. Bei der bei 50° digerierten Probe war das Eiweiß überhaupt restlos in $^2/_3$-Alkohol löslich geworden.

Die beiden mit 0,2% Säure angesetzten Proben gaben eine violette Biuretreaktion. Die Stickstoffbestimmungen vom Rückstand des wässerig-alkoholischen Filtrats (nach Kjeldahl) lieferten sehr geringe Werte. Augenscheinlich wird also durch 0,2%ige Salzsäure der Eiweißschlamm unter den innegehaltenen Bedingungen bei 8 stündiger Digestion nur äußerst schwach und zögernd angegriffen.

Die Kontrollprobe (Nr. 8 in Tabelle 10), d. i. Eiweißschlamm ohne jeden Zusatz, ergab bei der Biuretreaktion rein blauen Farbenton und die Kjeldahlbestimmung keine Spur gelösten Stickstoff; demnach war der Eiweißschlamm gut ausgewaschen worden, und nachher hatte auch nicht die geringste Lösung von Stickstoff mehr stattgefunden.

Unser Hauptinteresse galt natürlich den Proben, in denen Eiweißschlamm mit Kleie digeriert worden war. Sie wurden auf den in $^2/_3$-Alkohol löslichen Stickstoff untersucht. Bei der

Berechnung zogen wir mit Rücksicht auf die Trockensubstanz des Eiweißes und der Kleie 10 ccm von dem Gesamtvolumen der wässerig-alkoholischen Flüssigkeit ab.

Schon der massige Filterrückstand ließ vermuten, daß wenig abgebautes Eiweiß ins Filtrat übergegangen war. Tatsächlich ergab die Bestimmung nach Kjeldahl ganz geringe N-Werte, nämlich nur zwischen 24 und 40 mg, und diese rühren wohl zweifellos lediglich von dem Stickstoff der zugesetzten Kleie her. Ein Beweis für diese Annahme wird durch den Ausfall der beiden bei 50° gehaltenen Proben mit roher und mit sterilisierter Kleie erbracht, bei denen beidemale im Filtrat nahezu gleichviel Stickstoff gefunden wurde.

Folglich kann eine proteolytische Wirkung der Kleie auf Eiereiweißschlamm nicht stattgefunden haben, und es erweist sich also dieses tierische Eiweiß als unangreifbar für das proteolytische Enzym der Reiskleie.

Schlufssätze.

1. In der Reiskleie (Reisfuttermehl) haben wir diastatische und proteolytische Enzyme gefunden und ihre Wirkung quantitativ festgestellt.

2. Das „hochprozentige Reisfuttermehl“ hat in der Menge von 5 g ungefähr die gleiche diastatische Wirkung auf Reismehlkleister gezeigt wie 5 g Mundspeichel.

3. Die Reisfuttermehle, die den größten Teil der Frucht- und Samenschalen und Embryonen enthalten, zeigen stärkeren Fermentgehalt als die fast nur aus Spelzen bestehende „gemahlene“ und „gewalzte Kleie“.

4. Die Wirkung der untersuchten Enzyme wurde in den ersten Stunden am ausgiebigsten gefunden. Ihr Temperaturoptimum liegt um 55°. Bei 70° ist die Wirkung nur noch sehr gering. Durch halbstündiges Erhitzen der Kleie im strömenden Wasserdampf werden die Enzyme vernichtet.

5. Zur vollständigen Verzuckerung von 1 g Reismehl waren bei 37° in 48 Stunden 4 g Kleie in Form des „hochprozentigen Reisfuttermehles“ erforderlich.

6. Die proteolytischen Enzyme haben bei Prüfung ihrer Wirkung auf die Proteinstoffe der Reiskleie wesentlich niedrigere

Abbauwerte ergeben als die diastatischen. Ihre Leistung ist in schwach saurer Lösung (0,2% HCl) größer als in neutraler und alkalischer (0,2% NaOH).

7. Die proteolytischen Enzyme haben auf tierisches Eiweiß (Hühnereiweißschlamm) keine Wirkung erkennen lassen.

Vorliegende Arbeit wurde auf Veranlassung von Herrn Professor Dr. L. Heim und unter seiner Leitung sowie mit der gütigen Mithilfe von Herrn Professor Dr. Oskar Schulz, dem Leiter der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts, im hygienischen Institut der Universität Erlangen ausgeführt.

Ich möchte nicht verfehlen, den beiden Herren auch an dieser Stelle den ganz ergebensten Dank zum Ausdruck zu bringen.

Lebenslauf.

Als der älteste Sohn der Baumeisterseheleute Adam Keller aus Darmstadt und Ida Keller, geb. Bachschmied, aus Kaufbeuren wurde ich am 19. Oktober 1887 zu Augsburg geboren, besuchte dort vier Jahre die Volksschule und sechs Jahre das humanistische Gymnasium St. Anna; dann trat ich an das humanistische Gymnasium in Günzburg über, wo ich im Jahre 1906 absolvierte. Nach dreisemestrigem Architekturstudium an dem Polytechnikum in München belegte ich an der dortigen Universität, um nunmehr Medizin zu studieren; von meinem elfsemestrigen Medizinstudium treffen zwei Semester auf die Münchner und neun auf die Erlanger Universität. Die ärztliche Vorprüfung bestand ich im Sommer 1910 in Erlangen, dortselbst bestand ich auch im Herbste 1913 die ärztliche Prüfung. Als Medizinalpraktikant war ich drei Monate im städtischen Krankenhaus in Rothenburg und seitdem an dem hygienisch-bakteriologischen Institut der Universität Erlangen unter der Leitung von Herrn Professor Dr. L. Heim beschäftigt; unter seiner Leitung und an seinem Institute durfte ich auch vorliegende Arbeit anfertigen.

Ich bin bayerischer Staatsangehöriger und habe beim 19. Infanterieregiment in Erlangen vom 1. April 1909 bis 31. Oktober 1909 mit der Waffe gedient.

Fritz Keller.